

Susana Seseña Prieto

**CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA
DE CEPAS AUTÓCTONAS Y SELECCIÓN
DE CULTIVOS INICIADORES PARA LA
FERMENTACIÓN DE LA BERENJENA
DE ALMAGRO**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-505-3



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2007



TESIS DOCTORAL

Susana Seseña Prieto

2005

Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la Berenjena de Almagro

Susana Seseña Prieto

TESIS DOCTORAL
Toledo, 2005

Departamento
de Química Analítica y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias del
Medio Ambiente



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
Facultad de Ciencias del Medio Ambiente
Departamento de Química Analítica y Tecnología de los
Alimentos

**CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS
AUTÓCTONAS Y SELECCIÓN DE CULTIVOS
INICIADORES PARA LA FERMENTACIÓN DE LA
BERENJENA DE ALMAGRO**

SUSANA SESEÑA PRIETO

TESIS DOCTORAL
Toledo, 2005

Agradecimientos

A mi familia

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración y amistad de muchas personas que han compartido conmigo este tiempo, a las que desearía expresar mi más sincera gratitud.

En primer lugar, a la Dra. M^a de los Planos Palop Herreros, Directora de esta tesis Doctoral, por ofrecirme la posibilidad de iniciarme en el mundo de la investigación, por su constante interés y apoyo, por su ayuda y dedicación, y muy especialmente por su amistad.

A la Catedrática y Directora del departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Dra. M^a Dolores Cabezero Ibáñez, por acogerme y permitirme comenzar mi "andadura".

A los compañeros del Área de Tecnología de Alimentos, especialmente a "mis compis" de aquel fantástico e inolvidable año 99.

A la Dra. Isabel Sánchez por haber compartido conmigo todos sus conocimientos y haberme ayudado en mis comienzos. Al Dr. Miguel Ángel González Viñas por su ayuda en el Análisis Sensorial y estadístico. A los catadores, que desinteresadamente evaluaron las berenjenas.

A las empresas elaboradoras de Berenjenas de Almagro que han participado en este trabajo suministrándonos muestras o dejándonos utilizar sus instalaciones, especialmente a Raquel.

También quiero agradecer su apoyo incondicional a todos y cada uno de los amigos y compañeros de la Facultad de Medio Ambiente, que he ido conociendo en este tiempo y que han compartido conmigo estos años, especialmente:

A los técnicos de laboratorio de esta facultad, Agustín, Milagros, Ana y Ángel, porque siempre que he necesitado ayuda o "préstamos" han estado ahí. A Diego por su ayuda con el diseño.

A mis compañeras en los inicios del laboratorio de Microbiología en Toledo, Bonastre y Cristina por ayudarme a poner "todo en marcha". A Susana Peralta por su amistad, su alegría y por su paciencia iniciándome en la Biología Molecular. A los profesores de esta facultad, en especial a todos los que comparten sobremesa diaria conmigo, por sus sabios consejos y su ayuda. A Eva, Carolina, Nuria, Elena y Jete por sus ánimos.

A mis compañeros del resto de laboratorios, a mi vecina Carmen por ser una gran compañera y amiga, a Bea y Ana, "mis inorgánicas favoritas" (gracias chicas, que haría sin nuestras risas), a Juan y Diana por todos los interesantes cafés compartidos, a María por su ánimo y apoyo constante, a Vir por "ser como es", a Natalia por darme siempre su particular punto de vista sobre la vida, a Mariago porque desde nuestros inicios en el laboratorio juntas me ha demostrado siempre su cariño y amistad, a Laura, "mi psicóloga personal" a la que admiro y quiero, por saber escuchar.

A todos los compañeros que pasaron por esta facultad y compartieron mis "penas y alegrías", especialmente a Juanjo que me hizo probar el mejor "salmorejo" del mundo, a Aili, la canaria más simpática y buena gente que he conocido, a Laura por todo lo compartido y a Mikel, por saber siempre "salvarte" cuando lo necesitas.

A mis amigos de toda la vida (la "pandilla gastronómica"), por devolverme a la realidad de que no todo es "ciencia" en la vida, muy especialmente a Mari Paz por "estar siempre". A Miguel, por haber creído siempre en mí y en que este momento llegaría.

A Inma, Cristina, Sergio e Urache, porque desde nuestros comienzos en químicas, siempre me han demostrado su apoyo, cariño y amistad.

A Sergio por todo su "apoyo moral" y por haberme enseñado "un mundo diferente" este último año.

A toda mi gran familia, por hacerme sentir tan afortunada y "arropada" en todo momento. Especialmente a mis padres, porque gracias a ellos me he convertido en quien soy, por su comprensión, su cariño y su incondicional apoyo siempre.

*Por último, no encuentro palabras para expresar todo mi agradecimiento a Ana. Gracias por JCD, por sus sabios consejos, por su atenta escucha, por su desinteresada ayuda, por su comprensión y "tolerancia", por su constante apoyo, gracias por ser mi amiga y gracias por estar
89fMRF.*

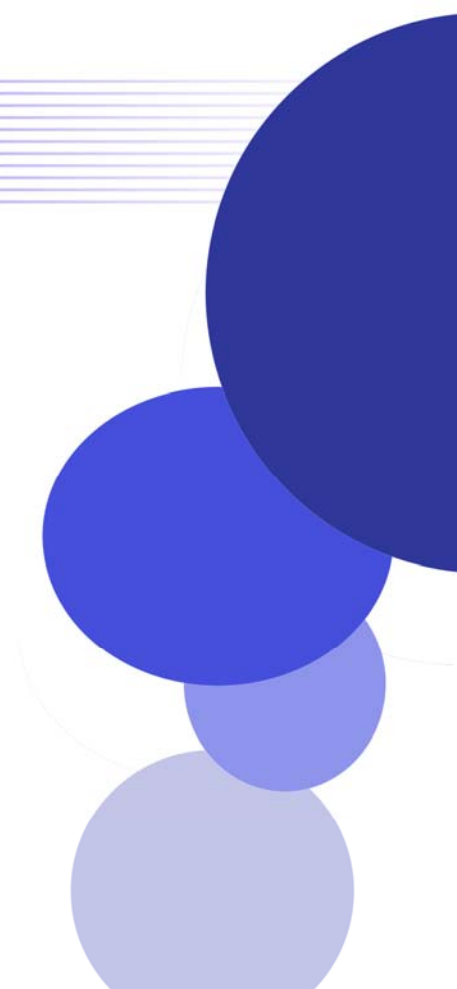
***Sólo una cosa hace que un sueño
sea imposible: el miedo a fracasar***

Paulo Coelho, *El Alquimista*

***Amigos son aquellos extraños
seres que nos preguntan cómo
estamos y se esperan a oír
la contestación***

Ed Cunningham

Índice



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. LA FERMENTACIÓN.....	3
1.1. SIGNIFICADO Y ORIGENES.....	3
1.2. TIPOS DE FERMENTACIÓN.....	4
1.2.1. Fermentación láctica de vegetales.....	8
1.2.1.1. Fermentación espontánea.....	9
1.2.1.2. Fermentación dirigida: uso de cultivos iniciadores o “starters”.....	12
2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....	16
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DE CULTIVO.....	16
2.2. TAXONOMÍA DEL GRUPO.....	18
2.3. METABOLISMO.....	21
2.4.1. Metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados.....	21
2.4.2. Metabolismo de los compuestos nitrogenados.....	27
2.4. COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....	30
2.5. MÉTODOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....	37
2.5.1. Métodos fenotípicos.....	37
2.5.2. Métodos físico-químicos	39
2.5.3. Métodos moleculares.....	41
2.6. APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.....	52
3. LOS ENCURTIDOS.....	56
3.1. LA BERENJENA DE ALMAGRO.....	57
3.1.1. Vínculo con el medio.....	58
3.1.2. El cultivo de las berenjenas de Almagro	60
3.1.3. Elaboración de las Berenjenas de Almagro.....	62

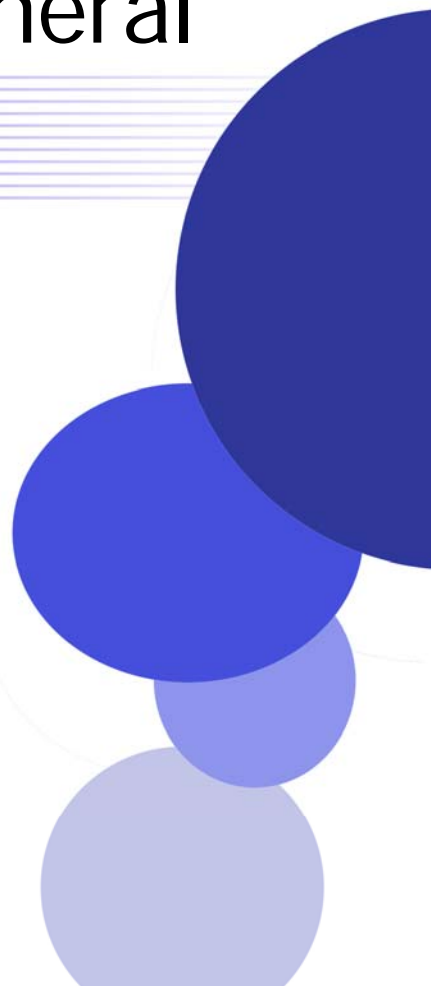
OBJETIVOS	71
 CAPÍTULO 1. EFECTO DE LA CONGELACIÓN DE LOS FRUTOS EN LA FERMENTACIÓN Y EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LAS BERENJENAS DE ALMAGRO.....	 77
1.1. INTRODUCCIÓN.....	79
1.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
1.2.1. Material.....	81
1.2.2. Diseño experimental.....	81
1.2.3. Métodos.....	82
1.2.3.1. Análisis químico.....	82
1.2.3.2. Análisis microbiológico.....	83
1.2.3.3. Análisis sensorial	88
1.2.3.4. Análisis estadístico de los resultados.....	91
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	92
1.3.1. Evolución de la fermentación.....	92
1.3.2. Identificación de los aislados.....	94
1.3.3. Análisis sensorial.....	103
1.4. CONCLUSIONES.....	107
 CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA UTILIZACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES EN LA FERMENTACIÓN Y EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LAS BERENJENAS DE ALMAGRO.....	 109
2.1. INTRODUCCIÓN.....	111
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	113
2.2.1. Material.....	113
2.2.2. Diseño experimental.....	113
2.2.3. Métodos.....	114
2.2.3.1. Análisis químico	114
2.2.3.2. Análisis microbiológico.....	115

2.2.3.3. Análisis sensorial.....	115
2.2.3.4. Análisis estadístico de los resultados.....	115
2.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
2.3.1. Evolución de la fermentación.....	116
2.3.2. Análisis sensorial.....	118
2.4. CONCLUSIONES.....	122
CAPÍTULO 3. SELECCIÓN DE UN CULTIVO INICIADOR PARA LA FERMENTACIÓN DIRIGIDA DE BERENJENAS DE ALMAGRO Y ESTUDIO DE SU CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN UTILIZANDO LA TÉCNICA RAPD-PCR	123
3.1. INTRODUCCIÓN.....	125
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	127
3.2.1. Cultivos y condiciones de cultivo.....	127
3.2.2. Caracterización tecnológica.....	127
3.2.2.1. Producción de aminas biógenas.....	127
3.2.2.2. Producción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	128
3.2.2.3. Presencia de las actividades pectinásica, celulásica y poligalacturonásica.....	129
3.2.2.4. Cálculo de la velocidad de crecimiento.....	130
3.2.2.5. Actividad acidificante.....	130
3.2.2.6. Tolerancia a la sal.....	130
3.2.2.7. Estudio de la capacidad bacteriocinogénica.....	131
3.2.3. Ensayos de fermentación.....	134
3.2.4. Análisis químico y microbiológico de las salmueras.....	134
3.2.5. Seguimiento de los cultivos inoculados.....	135
3.2.5.1. Preparación de los extractos crudos de ADN.....	136
3.2.5.2. Amplificación del ADN.....	136
3.2.5.3. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación.....	138

3.2.5.4. Estudio de reproducibilidad y análisis numérico de los perfiles de polimorfismo de ADN.....	138
3.2.6. Análisis sensorial.....	139
3.2.7. Análisis estadístico de los resultados.....	140
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	141
3.3.1. Caracterización tecnológica de las cepas.....	141
3.3.2. Ensayos de fermentación.....	147
3.3.2.1. Diseño de los cultivos iniciadores.....	147
3.3.2.2. Evolución de las fermentaciones y seguimiento de los cultivos inoculados.....	148
3.3.4. Análisis sensorial.....	154
3.4. CONCLUSIONES.....	157
CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE IMPLANTACIÓN A ESCALA INDUSTRIAL DE CULTIVOS INICIADORES SELECCIONADOS PARA LA ELABORACIÓN DE BERENJENAS DE ALMAGRO.....	159
4.1. INTRODUCCIÓN.....	161
4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	162
4.2.1. Cultivos utilizados.....	162
4.2.2. Diseño experimental.....	162
4.2.3. Evolución de la fermentación.....	164
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	165
CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA MICROBIOTA LÁCTICA QUE PARTICIPA EN LA FERMENTACIÓN DE BERENJENAS DE ALMAGRO EN DISTINTAS EMPRESAS ELABORADORAS Y EN DISTINTAS CAMPAÑAS.....	169
5.1. INTRODUCCIÓN.....	171
5.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	173
5.2.1. Toma de muestras.....	173
5.2.2. Análisis de las salmueras.....	174

5.2.2.1. Análisis químico.....	174
5.2.2.2. Análisis microbiológico	174
5.2.3. Obtención de aislados de bacterias lácticas.....	174
5.2.4. Caracterización genotípica (genotipado).....	175
5.2.5. Identificación de los aislados de bacterias lácticas.....	176
5.2.6. Análisis sensorial.....	178
5.2.7. Análisis estadístico.....	179
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	180
5.3.1. Estudio de la diversidad genética de la microbiota láctica presente en las salmueras de tres empresas elaboradoras.....	180
5.3.1.1. Análisis químico..	180
5.3.1.2. Análisis microbiológico y obtención de aislados de bacterias lácticas	182
5.3.1.3. Genotipado de los aislados.....	185
5.3.1.4. Análisis sensorial.....	198
5.3.2. Estudio comparativo de la microbiota que participa en la fermentación espontánea de las Berenjenas de Almagro en diferentes campañas.....	199
5.3.2.1. Análisis químico y microbiológico de las salmueras.....	199
5.3.2.2. Genotipado de los aislados.....	200
5.4. CONCLUSIONES.....	206
CONCLUSIONES FINALES.....	207
BIBLIOGRAFÍA.....	209
PUBLICACIONES	

Introducción general



1. LA FERMENTACIÓN

1.1. SIGNIFICADO Y ORÍGENES

El término fermentación deriva del latín “fervere” (hervir) y ha sido definido por la RAE como “un proceso de cambio con efervescencia...un estado de agitación o de inquietud...cualquiera de las diversas transformaciones de las sustancias orgánicas”.

Aunque éste término se utilizó en sus orígenes para describir la formación masiva de CO₂ que se producía cuando las levaduras se desarrollaban sobre un sustrato azucarado, actualmente define un proceso en el que un sustrato se transforma en un producto o productos, por la acción de los microorganismos.

No obstante, su significado puede variar y así, desde el punto de vista bioquímico el término “fermentación” se refiere al mecanismo de obtención de energía a través del catabolismo de compuestos orgánicos ocurrido en ausencia de O₂, mientras que en Microbiología Industrial, se trata de un concepto mucho más amplio y se aplica a los procesos que emplean microorganismos para obtener un determinado producto.

Para que una fermentación tenga lugar se necesita por tanto de la presencia de un sustrato, unos microorganismos y unas condiciones físicas adecuadas.

Aplicada a los alimentos, la fermentación es una técnica de conservación utilizada desde antiguo, que permite obtener productos con características físicas, químicas y organolépticas totalmente distintas de las de la materia prima de la que proceden. Existen referencias que indican que en muchas civilizaciones antiguas se consumían alimentos obtenidos por fermentación como el vino, la cerveza, las leches fermentadas, el pan o los encurtidos. Con el paso del tiempo, cada país ha desarrollado su propia tradición en la preparación y producción de alimentos fermentados y como muestra de ello, cabe destacar que mientras los países orientales prefieren el uso de los mohos para la elaboración de una gran variedad de leches fermentadas, en los occidentales es más frecuente el uso de bacterias y de levaduras (Buckenhüskes, 1990 y 1993).

La fermentación aporta a los alimentos interesantes beneficios (Bourgeois y Larpent, 1989; Giraffa, 2004) así por ejemplo,

- Mejora la calidad sensorial y las características organolépticas en general, al modificar la textura y el aroma de los mismos.
- Incrementa el valor nutritivo, por la síntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales y proteínas y por la degradación de factores antinutricionales que realizan los microorganismos.
- Aumenta la seguridad de los alimentos, al reducir la presencia de compuestos tóxicos como las aflatoxinas y/o los compuestos cianogénicos.
- Proporciona estabilidad a los alimentos, por la síntesis de compuestos antimicrobianos que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos, lo que hace aumentar su vida útil.
- Es una fuente de valor añadido a la materia prima, sobre todo de los productos agrícolas, pues permite ampliar el periodo de suministro al mercado, problema importante por la corta estacionalidad de frutas y hortalizas (Hansen, 2002; Holzapfel, 2002).

Finalmente, hay que señalar que la fermentación requiere menor consumo energético que otros métodos de conservación de alimentos.

1.2. TIPOS DE FERMENTACIÓN

Las transformaciones más importantes de los alimentos por fermentación tienen como principal sustrato los carbohidratos y son fundamentalmente de tres tipos: la fermentación láctica, la fermentación alcohólica y la fermentación acética. Cada una de ellas es producida por unos microorganismos específicos, obteniéndose distintos productos finales. Así, mientras en la fermentación alcohólica se produce etanol como producto mayoritario y es realizada por las levaduras, en la fermentación acética se produce la oxidación del etanol a ácido acético y es realizada por bacterias del género *Acetobacter*. Por su parte, en la fermentación láctica se produce ácido láctico como producto único o mayoritario y es realizada por un grupo de bacterias denominadas **bacterias lácticas** (BL). En ésta, hay que distinguir entre la denominada fermentación homofermentativa u

homoláctica, que es aquella en la que a partir de una molécula de glucosa se producen dos moléculas de ácido láctico, y la heterofermentativa o heteroláctica en la que además de una molécula de ácido láctico se obtienen entre otros productos etanol, ácido acético y CO_2 .

La conservación de los alimentos por fermentación láctica, aunque en el mundo occidental tiene un papel secundario con respecto a otras técnicas más modernas como el tratamiento térmico, la congelación o la deshidratación, continúa siendo, incluso en los países más desarrollados, un método muy utilizado para la conservación de algunos alimentos, como los vegetales o los productos cárnicos, y como sistema de obtención de una gran variedad de productos lácteos.

Otras fermentaciones posibles, aunque en ocasiones indeseables, son las que se recogen en la Tabla 1.

TABLA 1. Fermentaciones bacterianas que transcurren a través de la ruta glucolítica

Fermentación	Productos principales del ácido pirúvico	Microorganismo responsable
Ácido-mixta	Ácido láctico Ácido acético Ácido succínico Ácido fórmico (o CO_2 y H_2) Etanol	<i>Escherichia</i>
Butanodiólica	Idem anterior, pero además 2,3-Butanodiol	<i>Enterobacter</i>
Butírica	Ácido butírico Ácido acético CO_2 y H_2	<i>Clostridium</i>
Acetona-butanólica	Idem anterior, pero además butanol, etanol, acetona, isopropanol	<i>Clostridium</i>
Propiónica	Ácido propiónico Ácido acético CO_2	<i>Propionibacterium</i>

Las rutas metabólicas para la fermentación de la glucosa utilizadas por los distintos microorganismos y sus correspondientes productos finales, se muestran de forma esquemática en la Figura 1.

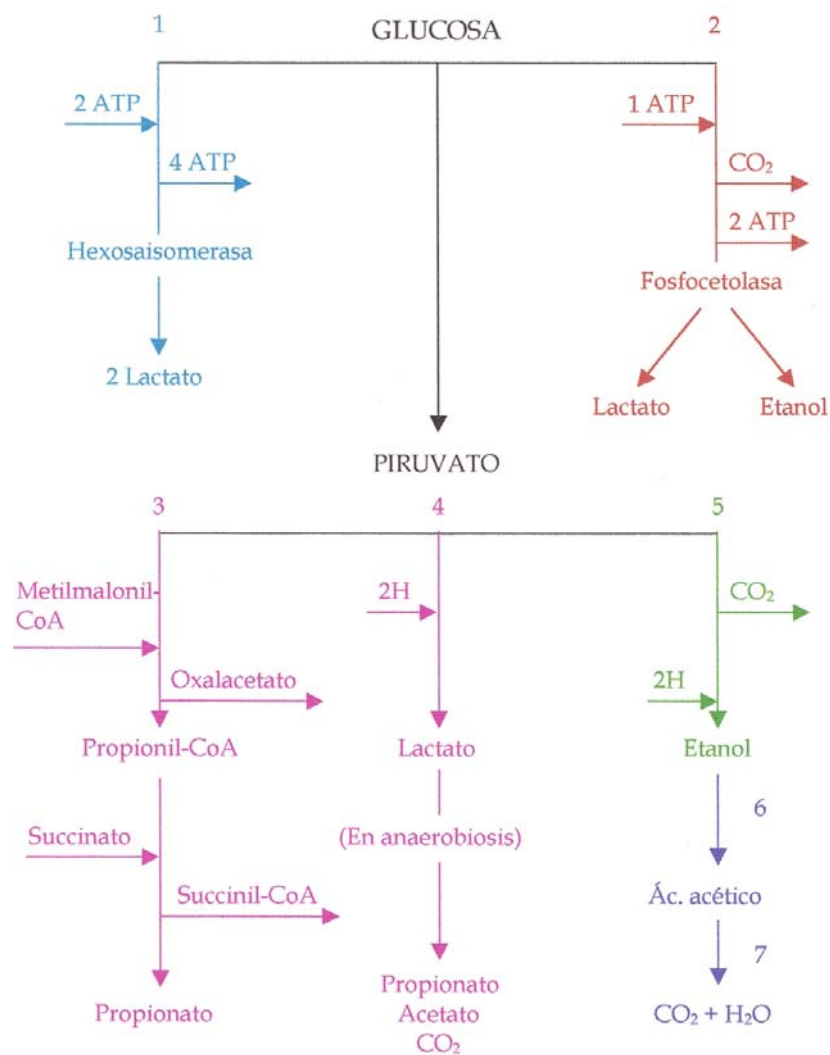


FIGURA 1. Vías metabólicas para la fermentación de la glucosa utilizadas por algunos microorganismos. 1: Bacterias lácticas homofermentativas; 2: Bacterias lácticas heterofermentativas; 3 y 4: *Propionibacterium*; 5: *Saccharomyces* spp. 6: *Acetobacter* spp.; 7: Cepas de *Acetobacter* "superoxidantes".

1.2.1. Fermentación láctica de vegetales

La mayoría de los vegetales han sido o pueden ser conservados por fermentación. Los más conocidos en Europa y en Estados Unidos son las aceitunas, de las que España es el primer productor, los pepinillos y la col fermentada (“col ácida” o “sauerkraut”) y, en menor grado, otros muchos como las cebolletas, las zanahorias, la coliflor, las berenjenas o las alcaparras.

En su elaboración el efecto combinado de la sal y del vinagre, añadidos en la salmuera de fermentación, ejerce un control selectivo del crecimiento microbiano, favoreciendo el desarrollo de las bacterias lácticas naturalmente presentes en los frutos, que son las que transforman los azúcares de los frutos en ácido láctico. Como consecuencia de esta fermentación se producen además importantes cambios en el color, la textura, el sabor y el aroma de los frutos. Así por ejemplo, los pepinillos pasan de tener un color verde claro pálido a verde oscuro, cambio producido por la transformación de las clorofilas a y b en feoforbidos y feofitinas, la textura pasa a ser más crujiente y menos dura, desarrollándose además un sabor y aroma típicos, como consecuencia de la formación de ácido láctico y de otros compuestos volátiles como el ácido acético.

Un aspecto importante a tener en consideración en la fermentación de los vegetales es que, dado que los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias se encuentran en los frutos, la velocidad de crecimiento de las mismas y por consiguiente del proceso, va a depender de la velocidad de difusión de estos nutrientes a la salmuera. Este hecho puede hacer pensar que la fermentación tiene lugar exclusivamente en la salmuera, lo que ha sido desmentido por algunos autores como Montañó et al. (1992), quienes han comprobado que ésta ocurre simultáneamente en el interior de los frutos y en la salmuera. La estructura histológica del producto influirá notablemente en la velocidad de la fermentación y en el tipo de microorganismos involucrados (Daeschel et al., 1987). Así por ejemplo las levaduras, al ser células de mayor tamaño, no pueden atravesar los estomas, motivo por el que se han encontrado casi exclusivamente en la salmuera, mientras que las bacterias se han encontrado en ambas localizaciones.

En la fermentación de los vegetales pueden utilizarse dos tipos de procesos:

1.2.1.1. Fermentación espontánea

Es la que utiliza de forma mayoritaria la industria del sector. En ésta, los frutos frescos previamente acondicionados y escaldados, son colocados en recipientes adecuados donde se añade una salmuera de diferente composición según el tipo de producto a elaborar, iniciándose entonces la fermentación. La microbiota epifítica de los frutos, que en estado fresco es numerosa y variada incluyendo BL y otros microorganismos, algunos de ellos potencialmente peligrosos como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter* (Etchells et al., 1975), es la responsable de la fermentación.

La velocidad y la extensión del crecimiento de las distintas especies microbianas durante la fermentación, y por consiguiente del proceso, dependerán tanto del tipo de producto como de las condiciones ambientales que concurren en el mismo, siendo la temperatura, la concentración de sal en la salmuera, la presencia de compuestos inhibidores naturales y el contenido en carbohidratos fermentables de los frutos, los factores más influyentes.

En la fermentación láctica espontánea de los vegetales se diferencian hasta 4 etapas (Fleming, 1982):

1. Inicio o iniciación

En ésta se desarrollan todo tipo de bacterias, Gram (+) y Gram (-), que proceden tanto de la materia prima como de los materiales utilizados, bidones, cajas, etc. Si bien, la adición a la salmuera de algunos ingredientes como el vinagre, contribuye al control del crecimiento de algunas bacterias indeseables como las enterobacterias.

Un factor de gran importancia que debe ser controlado en esta etapa es la velocidad de acidificación, ya que influirá notablemente en la calidad del producto final obtenido.

Al final de esta etapa, cuya duración varía con las condiciones ambientales, aparecen las bacterias lácticas. Su crecimiento ocasiona una acidificación progresiva del medio y la consiguiente desaparición de otras bacterias presentes.

2. Fermentación primaria

En ésta existe un claro predominio de las bacterias lácticas aunque también pueden aparecer levaduras fermentativas.

Los principales factores que gobiernan la composición y la secuencia de aparición de las distintas especies de BL a lo largo de esta etapa son: 1) la composición inicial de la población microbiana del producto, 2) la velocidad de crecimiento en la salmuera utilizada, que dependerá a su vez de las condiciones químicas (acidez y concentración de sal) y ambientales (temperatura) de ésta, y 3) la tolerancia a la acidez de las mismas.

En términos generales, es frecuente encontrar una mezcla de especies homo y heterofermentadoras, entre las que predominan *Leuconostoc* (*Ln.*) *mesenteroides* (heterofermentadora), *Lactobacillus* (*L.*) *brevis* (heterofermentadora), *Pediococcus* (*P.*) *pentosaceus* (homofermentadora) y *L. plantarum* (homofermentadora) (Pederson, 1979). La especie *L. plantarum*, por su mayor ácido-tolerancia, es la que habitualmente se aísla al final de la fermentación primaria aunque esto depende del tipo de producto.

El final de la fermentación primaria viene dado por la inhibición de la microbiota láctica, producida como consecuencia del agotamiento de los azúcares y del notable descenso del pH de la salmuera, debido a la presencia de los ácidos láctico y acético. En este sentido, la capacidad tamponante de la salmuera y el contenido en carbohidratos fermentables de los frutos, son dos de los factores que más influyen en la extensión de esta etapa de fermentación primaria. La utilización de salmueras con gran capacidad tamponante, como aquellas que llevan acetato cálcico, permite prolongar la duración de esta fase y el consiguiente agotamiento de los azúcares, lo que evitará el posterior crecimiento de microorganismos poco deseables como las levaduras (Fleming et al., 1978).

3. Fermentación secundaria

Ésta se caracteriza por el crecimiento de levaduras fermentativas ácido-tolerantes, que utilizan la materia fermentable que pudiera quedar en la salmuera después de la inhibición de las BL.

El crecimiento de éstas, puede ocasionar algunos defectos en el producto, como por ejemplo un hinchamiento excesivo o la formación de cavidades o huecos interiores por el CO₂ y el H₂ producidos, defectos de especial importancia en los pepinillos. Algunas levaduras fermentativas como las pertenecientes al género *Saccharomyces*, pueden también producir un ablandamiento del vegetal, al producir enzimas pectinolíticos que modifican los constituyentes pécticos de los frutos (Vaughn, 1985). Por último indicar que algunas de estas levaduras son capaces de utilizar el ácido láctico formado en las etapas anteriores, lo que ocasiona un aumento del pH de la salmuera, favoreciéndose el desarrollo de otros microorganismos también indeseables (Montaño et al., 1992).

4. Post-fermentación

En esta última etapa, y como consecuencia de una contaminación ambiental, especialmente si la superficie de la salmuera está expuesta al aire, puede producirse un rápido crecimiento de levaduras, mohos oxidativos e incluso bacterias esporuladas que ocasionan un gran deterioro de los productos.

La Tabla 2 resume los microorganismos participantes en las diferentes etapas de la fermentación espontánea de los vegetales.

Tabla 2. Sucesión de especies microbianas en las distintas etapas de la fermentación espontánea de los vegetales

ETAPA	MICROORGANISMOS
Inicio	Bacterias Gram (+) y Gram (-)
Fermentación primaria	Bacterias lácticas y levaduras
Fermentación secundaria	Levaduras
Post-fermentación	Levaduras, mohos y bacterias esporuladas

La fermentación espontánea, a pesar de ser la más utilizada en la elaboración de encurtidos, presenta algunos inconvenientes que limitan el rendimiento del proceso y pueden afectar a la calidad del producto final. En primer lugar, es difícil predecir el curso de la fermentación, ya que depende de numerosos factores, muchos de ellos incontrolables. De una parte, la carga microbiana del producto fresco es extremadamente variable y su influencia sobre la velocidad y

correcta evolución de la fermentación es decisiva. Por otra, la temperatura ambiental en la época de elaboración, puede ser desfavorable para el crecimiento de la microbiota natural, lo que puede suponer la paralización o incluso la no iniciación de la fermentación.

1.2.1.2. Fermentación dirigida: uso de cultivos iniciadores o “starters”

Actualmente, la mayor parte de las fermentaciones industriales son procesos dirigidos en los que se añaden de forma deliberada cultivos de microorganismos específicos llamados cultivos iniciadores o “starters”. Estos podrían ser definidos como “preparaciones microbianas que contienen un elevado número de células de al menos un microorganismo y que se añaden para acelerar y conducir la fermentación de un alimento” (Leroy y De Vuyst, 2004). Las ventajas de su uso no se limitan a la reducción del tiempo de fermentación, sino que además disminuyen la probabilidad de que se produzcan alteraciones y permiten la obtención de productos de mejor calidad organoléptica, más estables y homogéneos. Su utilización garantiza que las características organolépticas y la calidad higiénico-sanitaria del producto obtenido serán las adecuadas, aspectos con importantes repercusiones económicas (Smith y Palumbo, 1981 y 1983).

Ross et al. (2002) utilizan el término “biopreservación” para designar la prolongación de la vida útil de un alimento y la mejora de su calidad sanitaria, derivadas de la utilización de microorganismos y/o sus metabolitos. En este sentido es bien conocido que además de su función tecnológica, los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores son seleccionados, entre otras razones, por producir un amplio rango de compuestos antimicrobianos, que inhibirán el crecimiento de microorganismos alterantes y/o patógenos potencialmente presentes en los alimentos (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996).

Por todo ello, actualmente la industria alimentaria relacionada con la producción a gran escala de productos fermentados, utiliza casi exclusivamente cultivos iniciadores que contienen cepas definidas, que han reemplazado a las viejas prácticas de fermentación basadas en el “pie de cuba” o en el empleo de iniciadores con una mezcla de cepas “desconocidas” (Ross et al., 2002).

Este hecho ha propiciado la utilización intensiva de unas pocas cepas con excelentes cualidades, lo que no es del todo recomendable porque ocasiona problemas como los de pérdida de biodiversidad en los correspondientes nichos ecológicos o los causados en la industria láctea por la presencia de bacteriófagos (Klaenhammer y Fitzgerald, 1994). En los últimos años la Unión Europea ha manifestado un creciente interés por preservar la biodiversidad de los microorganismos involucrados en la producción de alimentos fermentados tradicionales (EC, 1999), amenazada por el uso extendido de cultivos iniciadores.

El diseño de cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos es un complejo proceso que requiere 1) un estudio ecológico de los ecosistemas naturales de fermentación para conocer la microbiota presente en los mismos (Vogel et al., 2002), ya que las cepas allí presentes serán las mejor adaptadas a las condiciones del medio y 2) el estudio de las propiedades tecnológicas y fisiológicas de las cepas predominantes, para seleccionar aquellas que presenten las mejores propiedades para ser utilizadas a nivel industrial (Quiberoni et al., 1998). Las propiedades deseables en estas cepas dependerán del tipo de producto a elaborar, y han sido descritas para aquellas utilizables en la elaboración de productos lácteos (Quiberoni et al., 1998), cárnicos (Erkkilä et al., 2001) y vegetales (Daeschel y Fleming, 1984; Daeschel et al., 1987). Finalmente, habrá que estudiar la capacidad de implantación de las cepas seleccionadas en el proceso industrial, para lo que será necesario utilizar técnicas de caracterización como las moleculares, con gran capacidad discriminante a la vez que metodológicamente sencillas (Ramos y Harlander, 1990), para hacer un seguimiento de las cepas inoculadas (Garriga et al., 1996; Quiberoni et al., 1998; Mora et al., 2000; Blaiotta et al., 2001; Cocolin et al., 2001; Marcellino et al., 2001; Brennan et al., 2002).

Las características deseables en los cultivos iniciadores que vayan a ser utilizados en la fermentación de productos vegetales son básicamente las siguientes:

- Capacidad acidificante. Una rápida producción de ácidos hará descender el pH de la salmuera, lo que inhibirá el crecimiento de microorganismos indeseables en la etapa inicial de la fermentación.

- Osmotolerancia (tolerancia a la sal), variando en este caso las exigencias en función del producto a elaborar.

- La T^a de crecimiento óptima de la cepa utilizada debe ser próxima a la T^a ambiente del lugar de fabricación, lo que permitirá una adecuada velocidad del proceso. Siempre será deseable que las cepas seleccionadas tengan además una tasa de crecimiento lo más alta posible a temperaturas por debajo de su óptimo, ya que muchos de estos procesos se llevan a cabo a temperatura ambiente y en ocasiones ésta es baja.

- Elevado poder fermentativo, lo que permitirá un consumo total de la materia fermentable en el menor tiempo posible con el mayor rendimiento.

- Baja producción de dióxido de carbono.

- Facilidad de sedimentación o floculación.

- Resistencia a los bacteriófagos y a inhibidores, tanto procedentes del fruto como de otros microorganismos.

- Mínimos requerimientos nutritivos.

- Capacidad para producir metabolitos inhibidores del crecimiento de otros microorganismos (peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas entre otros) lo que favorecerá su implantación en el proceso. Los importantes beneficios que el uso de cepas productoras de bacteriocinas puede reportar en la producción de alimentos fermentados, ha hecho que esta sea una de las características más buscadas en las cepas que vayan a formar parte de un cultivo iniciador (McMullen y Stiles, 1996; Muriana, 1996).

- Los productos obtenidos deben tener características organolépticas aceptables y propias.

- Capacidad para incrementar el valor nutritivo del vegetal.

- Preferiblemente, podrán ser conservados por congelación o liofilización, sin que se vean afectadas sus propiedades ni se ocasionen pérdidas en su actividad, lo que hará posible su producción a nivel industrial.

Además de estas, deben ser consideradas otras características más generales como:

- La seguridad, ya que en todos los casos debe tratarse de microorganismos considerados GRAS (Generally Recognized As Safe). Dentro de este apartado, es importante verificar que no presenten resistencias a los antibióticos transferibles (EC, 2003), ya que podrían entonces convertirse en potenciales reservorios para la transmisión de estas resistencias a través de la cadena alimentaria (Teuber y Perreten, 2000).

- La competitividad tecnológica. Los microorganismos añadidos deben ser capaces de llegar a predominar sobre la microbiota espontánea y desarrollar su actividad metabólica en las condiciones físico-químicas (salinidad, acidez, temperatura) bajo las cuales se elabora el producto y por último,

- La viabilidad económica. El procedimiento de obtención de estos cultivos iniciadores debe ser económicamente viable.

En la fermentación de vegetales, y a pesar de las ventajas anteriormente mencionadas, la utilización de cultivos iniciadores no está muy extendida por diversas razones:

- ✓ La propia complejidad del proceso fermentativo no ha permitido conocer en profundidad la importancia relativa de cada microorganismo en el mismo, lo que ha hecho difícil el diseño de un cultivo iniciador.

- ✓ La fermentación espontánea transcurre por lo general y siempre que la materia prima se procese correctamente, sin mayores problemas.

- ✓ La utilización como inóculo de salmuera “madre” en estado óptimo de fermentación, da normalmente buenos resultados.

- ✓ El tratamiento térmico necesario para eliminar la microbiota natural del vegetal, es costoso y en ocasiones imposible de llevar a cabo, al no disponer las industrias de las instalaciones necesarias.

- ✓ La tecnología que utiliza la industria de encurtidos no es la más adecuada para la fermentación con cultivos iniciadores.

Algunos autores han descrito la utilización de cultivos iniciadores en la elaboración de pepinillos (Etchells et al., 1973; Fleming, 1982; Rodrigo et al., 1984 y 1985), col fermentada (Christ et al., 1980; Leclaire, 1981; Giesschner et al., 1982; Kandler, 1983a) y aceitunas (Balatsouras et al., 1983; Ruiz Barba et al., 1994).

2. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y DE CULTIVO

Desde la antigüedad (3200 a.C.) existen referencias de la existencia de leches fermentadas, si bien la primera descripción de la participación de bacterias en éstas y otras fermentaciones se debe a Louis Pasteur, quién en el año 1857 las considera responsables del agriado del vino y de la cerveza. En el año 1873, Lister aísla y purifica a "*Bacterium lactis*" (actual *Lactococcus lactis*) a partir de leche ácida (Stiles y Holzapfel, 1997) y algunos años más tarde, en 1890, se introduce, casi simultáneamente en Dinamarca y Alemania por los científicos Weigmann y Storch respectivamente, el uso de estas bacterias como cultivos iniciadores para la fermentación de la leche.

Tradicionalmente bajo la denominación de "**bacterias lácticas**", se han incluido un grupo de bacterias con una gran diversidad morfológica y fisiológica, cuya característica principal es la de ser capaces de producir ácido láctico como metabolito final mayoritario (al menos un 50%) de la fermentación de los hidratos de carbono (Orla-Jensen, 1919; Sharpe, 1979). Kandler y Weiss (1986) las definen como "bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativo, inmóviles, de morfología celular cocoide o bacilar, con la característica principal de ser estrictamente fermentativas y producir como compuesto final de dicha fermentación ácido láctico, como producto único o mayoritario. Además son microaerófilas o anaerobias facultativas, incapaces de sintetizar citocromos, acidúricas o acidófilas y no reductoras de los nitratos".

Axelsson (1998) indica que no existe una definición inequívoca para un grupo tan heterogéneo desde el punto de vista taxonómico, ya que aunque la mayoría de las especies que lo integran cumplen las características anteriormente mencionadas, cuando se cultivan en condiciones "normales", pueden existir

excepciones, y así por ejemplo en medios ricos en sangre, algunas pueden presentar actividad catalasa o pseudocatalasa, mostrándose como catalasa (+).

Poseen además una gran especificidad fisiológica y sus requerimientos nutricionales son complejos, motivo por el que las BL se encuentran en la naturaleza asociadas a habitats ricos en nutrientes, como son algunos alimentos, leche, carnes y vegetales, la boca, el intestino, la vagina, etc. en los que son consideradas “inquilinos” habituales.

Por este motivo su cultivo en el laboratorio requiere de medios muy ricos que contengan diversos factores de crecimiento, como vitaminas del grupo B, aminoácidos preformados, péptidos y bases púricas y pirimidínicas, que resultarán por ello poco selectivos, como el MRS (Man et al., 1960), el agar Rogosa (Rogosa et al., 1951) o el agar sangre. Además, hay que tener en consideración que las BL utilizan los azúcares sólo como fuente de energía, mientras que el carbono necesario para el crecimiento lo toman de los aminoácidos (Parés y Juárez, 1997).

Con respecto al **pH de crecimiento** hay que indicar que aunque toleran bien los pHs ácidos, a medida que el medio se va acidificando como consecuencia de su crecimiento, disminuye el número de especies que son capaces de sobrevivir. La mayoría crecen e incluso prefieren pHs comprendidos en el intervalo entre 4,0 y 4,5, aunque puede encontrarse algún género o especie capaz de crecer a pH 3,9, como *L. plantarum* o *L. brevis* (Samelis et al., 1994) y otros que lo hacen a pHs comprendidos entre 9,2 y 9,6 como las especies *Streptococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* o aquellas del género *Carnobacterium* (Larpent, 1995; Axelsson, 1998).

Las bacterias de este grupo pueden agruparse atendiendo a su **temperatura óptima de crecimiento** en:

- Especies **mesófilas**, cuya temperatura óptima está comprendida en el intervalo de 22 a 34 °C. En este se incluyen la mayoría de las especies de todos los géneros.
- Especies **termófilas**, con una temperatura óptima entre los 37 °C y los 45 °C. En éste se incluyen algunas especies del género *Lactobacillus*, como *L.*

bavaricus, que se utiliza en la fabricación del yogurt, y algunas del género *Streptococcus* como *S. thermophilus*.

Por último, en cuanto a la **tolerancia al oxígeno** destacar que aunque por definición son especies microaerófilas, es decir sólo van a crecer bien con bajas presiones parciales de oxígeno, son generalmente aerotolerantes y la mayoría crecen mejor en atmósferas con un 5-10% de CO₂. Sólo algunas especies como *L. ruminis* y *L. vitulinus*, que se encuentran en el intestino de los animales, son anaerobias estrictas (Kandler y Weiss, 1986).

2.2. TAXONOMÍA DEL GRUPO

Los primeros intentos de clasificar taxonómicamente las BL se deben a Orla-Jensen (1919) quien, basándose en la morfología y la disposición celular y en criterios fisiológicos tales como, el tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa, el tipo de isómero del ácido láctico producido y la capacidad para desarrollarse a 10 y a 45 °C, clasificó a aquellas de morfología bacilar en los géneros: *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Microbacterium*, y a las de morfología cocoide en los géneros: *Streptococcus*, *Betacoccus* y *Tetracoccus*.

Esta primera clasificación ha sufrido diversas modificaciones con el paso de los años. En la edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* del año 1986, las bacterias con las características anteriormente descritas se incluyeron en los géneros *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Gemella*. A su vez, las especies del género *Lactobacillus* (Kandler y Weiss, 1986) fueron distribuidas en tres grupos dependiendo de que poseyeran o no las enzimas fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfoetolasa, enzimas claves del metabolismo homo y heterofermentativo, respectivamente. El grupo I comprendía a los lactobacilos homofermentativos obligados, el grupo II a los lactobacilos heterofermentativos facultativos y el grupo III a los lactobacilos heterofermentativos obligados.

En los últimos años, el desarrollo y la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares sofisticadas, como la determinación de la composición de bases guanina-citosina del ADN (mol% G+C), la hibridación de los ácidos nucleicos (ADN:ADN y ADN:ARN) y/o su secuenciación, han originado importantes cambios

en la taxonomía de las BL, la mayoría de los cuales aparecen reflejados en la 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). Así por ejemplo, esta edición recoge la división del género *Streptococcus* en tres géneros filogenéticamente distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Los estreptococos móviles, incluidos anteriormente en el género *Lactococcus*, forman parte ahora de un nuevo género el *Vagococcus* (Collins et al., 1989), de igual forma que, algunas especies del género *Lactobacillus*, han pasado a formar un nuevo género el *Carnobacterium* (Collins et al., 1987). La especie *Pediococcus halophilus* también ha pasado a formar parte de un nuevo género denominado *Tetragenococcus* (Collins et al., 1990).

Collins et al. (1993) constituyen el género *Weissella* con especies heterofermentadoras que habían pertenecido a los géneros *Lactobacillus* o *Leuconostoc* y Dicks et al. (1995) proponen que la especie *Leuconostoc oenos* alcance la categoría de género pasando a denominarse *Oenococcus*, siendo hasta el momento monoespecífico (*Oenococcus oeni*).

El género *Bifidobacterium* aunque tradicionalmente incluido en este grupo por producir ácido láctico a partir de la glucosa, está filogenéticamente más próximo al grupo de los actinomicetos, por lo que ha sido excluido del grupo de las bacterias lácticas (Axelsson, 1998).

Así pues, considerando como características definitorias de las BL: la respuesta positiva a la tinción Gram, la incapacidad de esporular, el carácter microaerófilo o anaerobio facultativo, la ausencia de citocromos, la de ser catalasa *sensu stricto* negativas, la capacidad para producir ácido láctico como metabolito final mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono, el poseer un contenido G+C inferior al 55 mol% y la de tener una estrecha relación con los alimentos, se establece que el grupo de las BL está constituido por los géneros: *Lactobacillus* (L.), *Carnobacterium* (C.), *Streptococcus* (S.), *Lactococcus* (Lc.), *Vagococcus* (V.), *Enterococcus* (E.), *Leuconostoc* (Ln.), *Oenococcus* (O.), *Pediococcus* (P.), *Weissella* (W.) y *Tetragenococcus* (T.). La Tabla 3 muestra las principales características fenotípicas de estos géneros.

TABLA 3. Características fenotípicas de las bacterias lácticas^a (Fuente: Axelsson, 1998).

	Bacilos		Cocos							
Característica	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc. Vagoc.</i>	<i>Leucon. Oenoc.</i>	<i>Pediac.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella</i> ^b
Formación de tétradas	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–
CO ₂ a partir de glucosa ^c	– ^e	±	–	–	–	+	–	–	–	+
Crecimiento a 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	–	+	+
Crecimiento a 45 °C	–	±	–	+	–	–	±	±	–	–
Crecimiento con 6,5% NaCl	ND ^f	±	+	+	–	±	±	–	+	±
Crecimiento con 18% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Crecimiento a pH 4,4	ND	±	–	+	±	±	+	–	–	±
Crecimiento a pH 9,6	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–
Ácido láctico ^d	L	D, L, DL ^g	L	L	L	D	L, DL ^g	L	L	D, DL ^g

^a+, positivo; –, negativo; ± respuesta variable según especies; ND, no determinada.^b*Weissella* también puede tener forma bacilar.^cHomo o heterofermentación de la glucosa: negativo y positivo indican homofermentación y heterofermentación, respectivamente.^dConfiguración del ácido láctico producido a partir de la glucosa.^ePequeñas cantidades de CO₂ pueden ser producidas, dependiendo del medio.^fCrecimiento negativo en 8% de NaCl.^gProducción de ácido D-, L- o DL-láctico varía entre especies.

2.3. METABOLISMO

Las bacterias lácticas tienen un metabolismo complejo y diverso lo que les permite adaptarse a situaciones cambiantes, aunque las condiciones de cultivo impuestas cuando se trabaja con ellas en el laboratorio limitan sin duda sus posibilidades (Axelsson, 1998).

Como se ha indicado anteriormente, la característica esencial del metabolismo de las bacterias lácticas es la producción de ácido láctico como principal metabolito de la fermentación de los carbohidratos, si bien dependiendo del sustrato disponible producirán además otros compuestos.

El estudio del metabolismo de las bacterias lácticas suele hacerse atendiendo al tipo de sustrato, habiéndose establecido dos grandes grupos:

- El de los azúcares y compuestos relacionados, donde se incluyen los ácidos orgánicos y,
- El de los compuestos nitrogenados

2.3.1. Metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados

Las bacterias lácticas tienen una gran capacidad para degradar diferentes carbohidratos y otros compuestos relacionados, siendo los azúcares el mejor sustrato para su crecimiento.

La Figura 2 muestra un esquema de las rutas metabólicas comúnmente utilizadas para la fermentación de estos compuestos.

Las dos más importantes son:

A) Glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (A en la Figura 2). Es la ruta a través de la cual las especies denominadas homofermentadoras, en condiciones de crecimiento estándar (concentraciones no limitantes de glucosa, disponibilidad de factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos, y cantidad de oxígeno limitada), metabolizan las hexosas produciendo dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP por mol de hexosa

fermentada, sin producción neta de poder reductor. El enzima clave en esta ruta es la fructosa-1,6-difosfato aldolasa. Estas especies carecen de los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa y por ello son incapaces de fermentar las pentosas o el gluconato.

Además de la glucosa, otras hexosas que también son fermentadas a través de esta vía por algunas BL son la **fructosa** y la **manosa** que entran a nivel de la glucosa-6P o de la fructosa-6P, después de una isomerización y/o fosforilación.

B) Ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK) (B en la Figura 2). En ésta se producen, además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos como etanol, acetato o CO₂, motivo por el que se conoce como ruta heterofermentativa. El rendimiento energético de esta reacción es un mol de ATP y 3 moles de NADH por mol de hexosa fermentada. Para recuperar el equilibrio redox de la reacción y, en ausencia de aceptores de electrones alternativos, será necesaria 1) la reducción del piruvato a lactato, reacción en la que se oxida uno de los moles de NADH y 2) que el acetil-fosfato se reduzca a etanol. En presencia de aceptores de electrones alternativos, se formará ácido acético en lugar de etanol como producto final.

La **fructosa** puede ser metabolizada a través de esta ruta de forma análoga a la glucosa y puede también actuar como aceptor de electrones en la oxidación del NADH, reduciéndose entonces gran parte de la misma a manitol. La reacción que sucede es la siguiente:



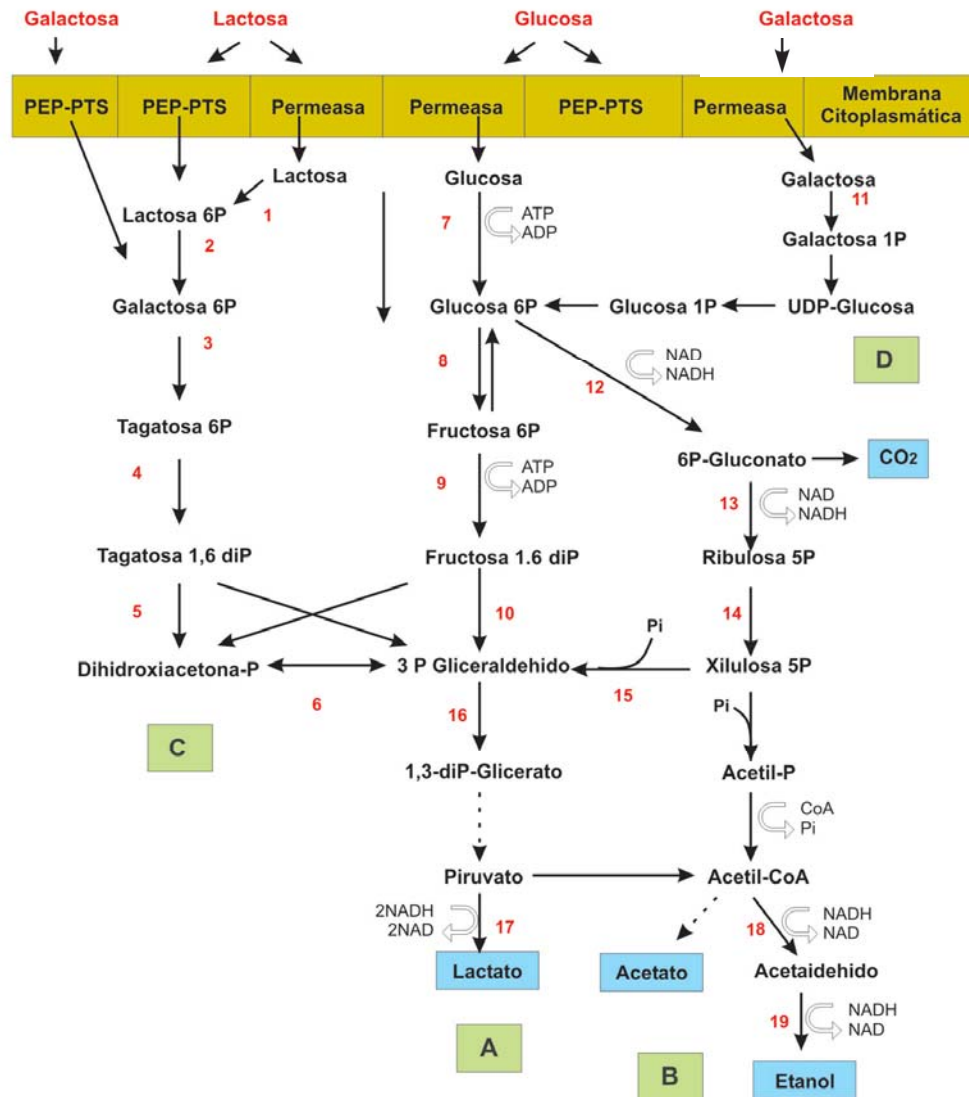


FIGURA 2. Principales rutas de transporte y metabolismo de azúcares utilizadas por las bacterias lácticas. (A) Fermentación homoláctica (glucólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas); (B) Fermentación heteroláctica (ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa); (C) ruta de la tagatosa-6-fosfato; (D) ruta de Leloir. Las enzimas numeradas son: 1, β-galactosidasa; 2, fosfo-β-galactosidasa; 3, galactosa-6P isomerasa; 4, tagatosa-6P quinasa; 5, tagatosa 1,6-diP aldolasa; 6, triosa-P isomerasa; 7, glucoquinasa; 8, glucosa-6P isomerasa; 9, fosfofructoquinasa; 10, 1,6-diP-aldolasa; 11, galactoquinasa; 12, glucosa-6P deshidrogenasa; 13, gluconato-6P deshidrogenasa; 14, ribulosa-P epimerasa; 15, fosfocetolasa; 16, gliceralehído-P deshidrogenasa; 17, lactato deshidrogenasa; 18, acetaldehído deshidrogenasa; 19, alcohol deshidrogenasa.

Las especies heterofermentativas pueden a su vez ser facultativas o estrictas. Las primeras metabolizan las hexosas por la vía de Embden-Meyerhof y además son capaces de transformar las pentosas en lactato y acetato, al poseer una fosfocetolasa inducida por la presencia de pentosas (Kandler, 1983b). Esta ruta es utilizada por un grupo de lactobacilos denominados tradicionalmente *Streptobacterium* (Orla-Jensen, 1919). Por el contrario, las heterofermentativas estrictas van a producir por cada mol de glucosa, un mol de ácido láctico, un mol de etanol o acetato y un mol de CO₂, siendo también capaces de fermentar las pentosas produciendo ácido láctico y acético.

Puede concluirse que las diferencias entre las BL homo y heterofermentativas, en lo que a productos finales de la fermentación se refiere, son consecuencia de diferencias básicas de tipo genérico y fisiológico. Las homofermentativas poseen los enzimas fructosa 1,6-difosfatoaldolasa y hexosa-isomerasa que no tienen las heterofermentativas, mientras que éstas últimas poseen una fosfocetolasa, de la que carecen las primeras.

El rendimiento energético de ambas rutas es también claramente diferente. Las bacterias homofermentativas son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa. Del mismo modo, que la cantidad de ácidos producida es mayor en la ruta homofermentativa que en la heterofermentativa.

Además de las diferencias fisiológicas comentadas, hay que tener en consideración que las condiciones de crecimiento pueden alterar significativamente los productos finales formados. Estos cambios pueden producirse por la alteración del metabolismo del piruvato y/o por el uso de otros aceptores de electrones externos, como el O₂ o algunos compuestos orgánicos (Axelsson, 1998).

Otros azúcares que también pueden ser fermentados son la galactosa y la lactosa. Para la fermentación de la **galactosa** existen dos sistemas de transporte, uno dirigido por una fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato (PEP-PTS) y otro que utiliza una permeasa. En el primer caso (C en la Figura 2), la galactosa-6P se incorpora a la ruta de la tagatosa-6P y converge en la glucólisis a nivel del

gliceraldehído-3-fosfato (GAP). En el segundo (D en la Figura 2), el azúcar después de la fosforilación entra en la glucólisis a través de la denominada ruta de Leloir.

Al igual que para la galactosa, en el transporte de la **lactosa** pueden también estar implicados dos mecanismos: uno de transporte activo a través de una permeasa y el sistema PEP-PTS. El sistema permeasa está presente en algunas bacterias termófilas (*S. salivarius* subsp. *termophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. delbrueckii* subsp. *helveticus*) y en los leuconostocs, mientras que el segundo es propio de los lactococos. En el transporte activo, la lactosa no sufre cambio alguno en el transporte y es posteriormente hidrolizada por una β -galactosidasa (β -gal) a galactosa, que se incorpora a la ruta de Leloir, y a glucosa que puede entrar tanto a la ruta homofermentativa como a la heterofermentativa (Kandler, 1983b; Fox et al., 1990). En el sistema PEP-PTS la lactosa es fosforilada durante el transporte y entra en la célula como lactosa fosfato. Ésta es posteriormente hidrolizada por una fosfo- β -galactosidasa (P- β -gal) a glucosa, que entra a la glucólisis a través de la vía homofermentativa, y a galactosa-6P, que lo hace a través de la ruta de la tagatosa-6P (De Vos y Vaughan, 1994; Axelsson, 1998). Los sistemas para el metabolismo de la lactosa de *Lc. lactis* y *L. casei* son los mejor conocidos.

Con referencia al ácido láctico producido, hay que indicar que existen dos posibles isómeros, el D(-) y el L(+), cuya formación depende de que el enzima que lleve a cabo la reducción del piruvato a lactato sea la D-lactato o la L-lactato deshidrogenasa. Las especies de bacterias lácticas pueden producir sólo uno de los isómeros o una mezcla de ambos y tiene importancia taxonómica el tipo de isómero producido. Cuando se producen ambos enzimas, éstos suelen tener distinta actividad, lo que da lugar a un exceso de uno de los isómeros y raramente se produce una mezcla racémica (Fleming et al., 1985).

El isómero L(+) es conocido como el “isómero fisiológico” ya que al ser similar al encontrado en el organismo humano, es mejor asimilado o más rápidamente metabolizado (Montaño et al., 1992). Este hecho propició que el Comité de Expertos de la FAO/WHO en el año 1974, recomendara la eliminación del isómero D(-) en los alimentos para niños. La importancia del tema hizo que se investigara acerca de la utilización de cepas que produjeran sólo este isómero en la elaboración de alimentos, investigaciones que llevaron al aislamiento de la especie

L. bavaricus, que ha sido utilizada en la elaboración a escala industrial de productos como el “sauerkraut” y las leches fermentadas.

Respecto al metabolismo de los **sustratos carbonados** es interesante destacar que las bacterias lácticas son capaces de degradar con cierta facilidad algunos ácidos orgánicos como el málico, el cítrico y el tartárico.

El **ácido málico** es un compuesto que se encuentra en cantidades importantes en los productos vegetales y en el vino, y es un sustrato común para algunas especies de este grupo que lo transforman en láctico y CO₂, proceso que se denomina “fermentación maloláctica”. El enzima que cataliza dicha reacción recibe el nombre de enzima maloláctica. Esta fermentación tiene una gran importancia en el proceso de vinificación contribuyendo en gran medida a la formación del gusto y del aroma de los vinos. La especie más importante es *Oenococcus oeni*.

El **ácido cítrico** está también presente en cantidades apreciables en la mayoría de los vegetales y es abundante en los productos lácteos fermentados, donde es considerado el principal precursor del aroma característico a “mantequilla”.

En enología la formación de acetaldehído, acetoína y diacetilo, es atribuida al catabolismo del ácido cítrico, en el que participan las BL. El ácido cítrico es descompuesto en una primera reacción por el enzima citratoliasa a los ácidos acético y oxal-acético, y éste último en una posterior descarboxilación, en la que participa el enzima oxal-acetato descarboxilasa, lleva a la formación de pirúvico y CO₂ (Fleming et al., 1985). El piruvato formado será el punto de partida de nuevas rutas metabólicas, que llevan a la formación de acetaldehído, acetoína y diacetilo.

Lc. lactis subsp. *lactis* var. *diacetylactis* y *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, son especies particularmente importantes en la industria por su capacidad para producir estos compuestos a partir del citrato.

El **ácido tartárico**, mayoritario en el mosto de uva y detectado también en vegetales aunque en cantidades poco importantes, es al igual que el málico un buen sustrato para el crecimiento de algunas BL. El mecanismo de degradación del tartárico es diferente según se trate de una bacteria homo o heterofermentativa,

produciéndose compuestos distintos en cada caso. Así, mientras las homofermentadoras forman acético, láctico y CO₂, las heterofermentadoras forman acético, CO₂ y cantidades minoritarias de ácido succínico (Radler, 1975).

Del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados, puede concluirse que, aunque la glucólisis es por lo general la ruta metabólica más utilizada por las BL y los productos resultantes de la misma los que con mayor frecuencia se encuentran en los alimentos fermentados, éstas son capaces de actuar sobre otros compuestos por exigencias de sus respectivos metabolismos, dando lugar a una gran variedad de productos como el acetaldehído, el diacetilo, el 2,3-butanodiol, la propanona, o los dextranos, que van a influir notablemente en la textura, el gusto, el olor y el color de los alimentos y, en definitiva, en las propiedades organolépticas de los mismos (Poolman, 1993; Axelsson, 1998).

2.3.2. Metabolismo de los compuestos nitrogenados

Las BL son capaces de transformar, utilizando distintas rutas metabólicas, las proteínas, los péptidos y algunos aminoácidos. Éstas han desarrollado “sistemas proteolíticos” complejos que les permiten utilizar eficientemente las fuentes de nitrógeno presentes en los medios de cultivo, liberando péptidos y/o aminoácidos, que serán transportados a través de la membrana citoplasmática, mediante sistemas de transporte específicos y finalmente utilizados en el interior celular (Law y Kolstad, 1983). A pesar de ello, la presencia de aminoácidos preformados en el medio es de gran importancia para estas bacterias, dada su limitada capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico (Thomas y Mills, 1981), además de que, como hemos indicado anteriormente, los utilizan como fuente de carbono (Parés y Juárez, 1997).

Los sistemas proteolíticos de las BL son complejos por diversas razones, 1) por la gran variedad de proteinasas y peptidasas que los componen 2) por su difícil localización celular, aspecto éste que plantea serios problemas metodológicos para su estudio y 3) por la multiplicidad de factores que intervienen en la producción y actividad de los mismos. Los más estudiados y mejor conocidos, por su importancia tecnológica en la fermentación de la leche, son los sistemas proteolíticos de los lactococos (Kunji et al., 1996) y en especial el de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, del que se

han aislado e identificado algunas de sus proteasas y peptidasas, tanto extracelulares como intracelulares (Monnet y Gripon, 1994). En este, las proteasas se localizan en su mayor parte a nivel de la pared celular, aunque también se ha detectado una débil actividad intracelular, mientras que las peptidasas están situadas tanto en la pared, como en la membrana citoplasmática, como en el citoplasma.

Por acción de las peptidasas se eliminan péptidos de pequeño tamaño, responsables del sabor amargo de algunos alimentos. En la última fase de la proteólisis se produce acumulación de aminoácidos libres, algunos de los cuales influyen en la textura, son una importante reserva de compuestos precursores de aromas y contribuyen al sabor característico de algunos alimentos. Así por ejemplo, la prolina está asociada con el gusto levemente dulce de los quesos suizos y la arginina con el sabor amargo de ciertos alimentos.

Además de la actividad proteolítica, entre las BL, es frecuente encontrar especies capaces de descarboxilar algunos aminoácidos, procesos que llevan a la formación de dióxido de carbono y de la correspondiente amina (Halász et al., 1994). La presencia de estas aminas denominadas "biógenas" ha sido descrita en algunos alimentos fermentados, como los embutidos (Bover-Cid et al., 2001; Silla Santos, 1998), los productos lácteos (Taylor, 1985; Stratton et al., 1991), los derivados del pescado (Taylor, 1985), los vinos (Coton et al., 1998; Landete et al. 2005) o los encurtidos (Silla Santos, 1996; Taylor et al., 1978), siendo en estos últimos la histamina, la más frecuentemente encontrada (Taylor et al., 1978; Iñigo y Abad, 1983 a y b).

En la Figura 3 se recogen algunos ejemplos de las aminas biógenas con mayor presencia en los alimentos y los aminoácidos a partir de los que se originan (Shalaby, 1996).

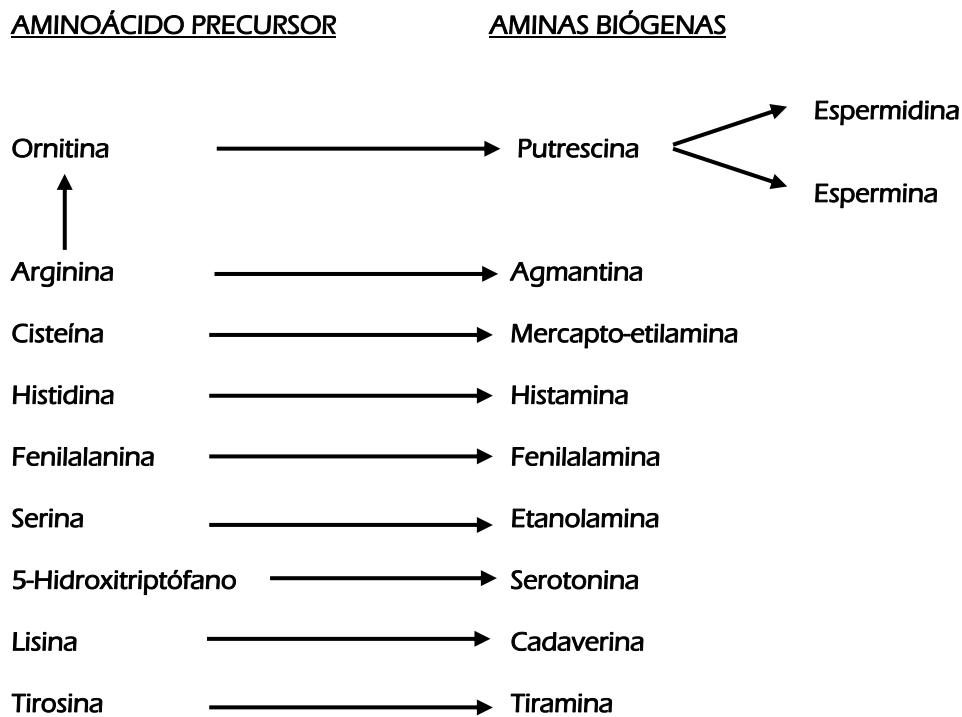


FIGURA 3. Aminoácidos descarboxilados por las BL y sus correspondientes aminas biógenas

El gran interés suscitado por estos compuestos, proviene del hecho de que algunas de ellas como la histamina, pueden ser tóxicas incluso ingeridas en bajas concentraciones. Además tanto la tiramina como la histamina tienen propiedades vasoactivas y/o psicoactivas, por lo que su presencia en los alimentos supone un riesgo importante para los consumidores (Mariné-Font et al., 1995).

No obstante, para que en los alimentos se produzca acumulación de aminas biógenas es necesario que confluyan estas circunstancias: disponibilidad de los aminoácidos precursores, presencia de microorganismos con actividad amino descarboxilasa y condiciones favorables tanto para su crecimiento como para la actividad descarboxilante (ten Brink et al., 1990).

La capacidad de las BL para descarboxilar aminoácidos es dependiente de la especie e incluso algunos autores (Beutling, 1996; Bover-Cid y Holzapfel, 1999) indican que tiene carácter intraespecífico, habiéndose observado claras diferencias tanto en la cantidad como en el tipo de amina producida, entre cepas de una

misma especie. Por géneros es el género *Lactobacillus* (Silla Santos, 1998) el que con mayor frecuencia ha sido identificado como responsable de la producción de aminas biógenas y más raramente los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* (Butturini et al., 1995).

Por los riesgos toxicológicos que la presencia de aminas biógenas en los alimentos puede suponer, la determinación de la capacidad aminobiogénica es uno de los estudios que deben realizarse en la selección de cepas para el diseño de cultivos iniciadores (Bover-Cid et al., 2000), especialmente en aquellos que van a ser utilizados en la elaboración de productos cárnicos, por su elevado contenido en proteínas. Esta determinación puede hacerse por distintos métodos, cuantitativos como la cromatografía de líquidos (Novella-Rodríguez et al., 2000) o cualitativos como el descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999), basado en el cambio de color que se produce en el medio de cultivo como consecuencia del incremento de pH producido por las descarboxilaciones. Otros autores (Lucas y Lonvaud-Funel, 2002) por el contrario, han optado por determinar la presencia de los genes que codifican para las enzimas implicadas en estas descarboxilaciones utilizando la técnica de la PCR o de reacción en cadena de la polimerasa.

Por último indicar que las BL pueden llevar a cabo otras transformaciones en los aminoácidos como son las reacciones de transaminación y de desaminación oxidativa, reacciones que, aunque menos frecuentes, son también de gran importancia ya que conducen a la formación de aldehídos, fenoles, indoles y otros compuestos azufrados fuertemente aromáticos, que pueden provocar malos olores en los alimentos fermentados (Fox y Wallace, 1997).

2.4. COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Es bien conocido que las BL producen diversos compuestos con potente efecto antimicrobiano, algunos de ellos utilizados para alargar la vida útil de los alimentos como por ejemplo: algunos ácidos orgánicos, el etanol, el dióxido de carbono, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo, el acetaldehído, los benzoatos, el isómero D- de algunos aminoácidos, algunos compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular como la reuterina y las bacteriocinas (Ouweland, 1998).

Los mecanismos por los que estos compuestos ejercen su efecto antimicrobiano son diversos. Así por ejemplo en el caso de los **ácidos orgánicos** (láctico, acético, etc.) es la fracción no disociada de los mismos la que ejerce la actividad antimicrobiana al interferir con funciones metabólicas esenciales (Baird-Paker, 1980). El **dióxido de carbono** es considerado un antimicrobiano de amplio espectro que actúa disminuyendo el pH extra e intracelular y desestabilizando las membranas celulares donde se acumula (Eklund, 1984). Por su potente actividad antimicrobiana se utiliza como conservante de carnes, pescados, frutas, verduras y hortalizas refrigeradas, donde inhibe el crecimiento de microorganismos psicrótrofos, y en la fermentación de vegetales y ensilados para prevenir el desarrollo de mohos (Lindgren y Dobrogosz, 1990). El **diacetilo** es también inhibidor de un gran número de bacterias Gram-negativas (Jay, 1982a), hongos y levaduras (Jay et al., 1983) y en menor medida bacterias Gram-positivas (Jay, 1982 b). Jay (1986) indica que el diacetilo actúa reaccionando con la arginina de los enzimas microbianos inactivándolos, al bloquear o modificar sus centros catalíticos.

De todos ellos, y por su potente efecto antimicrobiano, merecen ser destacados el **peróxido de hidrógeno** y las **bacteriocinas**.

Las bacterias lácticas en condiciones de aerobiosis son capaces de producir **peróxido de hidrógeno** a partir de la forma reducida de la nicotinamida-adenin-dinucleotido (NADH), por acción de una flavoproteína NADH:H₂O₂ oxidasa, y aunque no poseen catalasa, se autoprotegen de los efectos del H₂O₂ mediante actividades pseudocatalásicas o bien liberándolo al medio donde se acumula (Condon, 1987).

El efecto bactericida o bacteriostático del peróxido de hidrógeno es debido a su elevado poder oxidante, que provoca (i) la peroxidación de los lípidos de la membrana, incrementando de este modo la permeabilidad celular, y (ii) la inactivación de enzimas y coenzimas mediante la oxidación de sus grupos sulfhidrilo (Kong y Davidson, 1980). La elevada toxicidad de este compuesto también puede ser atribuida a su capacidad para destruir estructuras moleculares básicas como las proteínas y los ácidos nucleicos en los que es capaz de romper los enlaces intra e intercatenarios y de alterar las bases nitrogenadas, inhibiendo así la replicación cromosómica (Piard y Desmazaud, 1991).

La capacidad de las bacterias lácticas para producir este compuesto depende no sólo de las condiciones de cultivo (disponibilidad de oxígeno, agitación, etc) sino también de la cepa de que se trate (Collins y Aramaki, 1980). Es por tanto una propiedad con carácter intraespecífico deseable en las cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores. Diversos autores han descrito que algunas cepas de lactobacilos son capaces de producir una cantidad de peróxido de hidrógeno suficiente como para inhibir el crecimiento de algunas especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Proteus* (Price y Lee, 1970), *Listeria monocytogenes* (Tharrington y Sorrells, 1992), *Salmonella typhimurium* (Yap y Gilliland, 2000), *St. aureus* (Gilliland y Speck, 1977) y otra flora indeseable (Reinheimer y Demkov, 1989; Ouwehand, 1998).

Para la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de la producción de H_2O_2 se han descrito diversos métodos. Song et al. (1999) describen un método cualitativo en el que la cepa en estudio se hace crecer en un medio sólido al que se le añade tetrametilbencidina (TMB) y peroxidasa. Si la cepa produce peróxido de hidrógeno, la peroxidasa actuará oxidando la TMB y se producirá un pigmento azul sobre la colonia de la cepa productora. Los métodos cuantitativos están basados en determinaciones espectrofotométricas en las que se mide la absorbancia de un compuesto coloreado, producto de la oxidación llevada a cabo por el peróxido de hidrógeno formado o por la peroxidasa que actúa en su presencia (Reinheimer y Demkov, 1989; Yap y Gilliland, 2000).

El término **bacteriocinas** fue propuesto por Jacob et al. (1953) para designar a un grupo de sustancias de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana, producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Posteriormente han sido definidas por otros autores (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989 y 1992; Schillinger, 1990) como "proteínas o complejos proteínicos con actividad bactericida".

Jack et al. (1995) proponen en una extensa revisión sobre las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas, una nueva y más amplia definición considerando a las bacteriocinas como "un grupo heterogéneo de sustancias con capacidad antimicrobiana, de síntesis ribosomal, que se secretan al medio con o sin modificaciones postraduccionales y que poseen un espectro de acción

antimicrobiano reducido y limitado en ocasiones, a algunas cepas de la especie productora, lo que implica que el microorganismo productor debe poseer algún mecanismo que le confiere inmunidad a su propia bacteriocina". Nes et al. (1996) atribuyen esta inmunidad a la producción de una proteína de inmunidad específica mientras que otros autores (Abee, 1995; Jack et al., 1995) han sugerido que la inmunidad podría estar mediada por la acción de proteasas intracelulares que inactivarían la bacteriocina en las células productoras.

La bacteriocinogenicidad, o capacidad de producir bacteriocinas, es un fenotipo muy extendido entre las BL, como lo demuestra el hecho de que hayan sido descritas cepas productoras de bacteriocinas de todos los géneros de BL asociados con los alimentos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* y *Enterococcus* (De Vuyst y Vandamme, 1994).

La Tabla 4 recoge algunas de las bacteriocinas descritas y la especie productora. Las mejor conocidas son la nisina, que es producida por cepas de *Lactococcus lactis* y que está siendo utilizada como aditivo alimentario en algunos países, y la pediocina PA-1/AcH, producida por *Pediococcus acidilactici* (Bhunia et al., 1987) que ha sido descrita como muy efectiva frente a *Listeria monocytogenes*, un microorganismo que se muestra en muchas ocasiones insensible a la nisina (Pucci et al., 1988).

Los numerosos trabajos de investigación efectuados sobre las bacteriocinas, y en especial aquellas producidas por las BL, han permitido conocer en profundidad su estructura y sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus genes, los mecanismos implicados en su biosíntesis, procesamiento y transporte, así como la regulación de su producción (Schillinger, 1990; Daeschel, 1992; Piard et al., 1992; Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996; Messens y De Vuyst, 2002; Guinane et al., 2005).

TABLA 4. Ejemplos de bacteriocinas producidas por BL (Fuente: Chen y Hoover, 2003)

Bacteriocinas	Microorganismo productor	Referencia
Nisina	<i>Lc. lactis</i>	Hurst (1981)
Lactocina S	<i>L. sake</i>	Mortvedt et al. (1991)
Lacticina 481	<i>Lc. lactis</i>	Piard et al. (1992)
Pediocina PA-1/AcH	<i>P. acidilactici</i>	Henderson et al. (1992)
Sakacina A	<i>L. sake</i>	Holck et al. (1992)
Sakacina P	<i>L. sake</i>	Tichaczek et al. (1992)
Leucocina A-UAL 187	<i>Ln. gelidum</i>	Hastings et al. (1991)
Mesentericina Y105	<i>Ln. mesenteroides</i>	Hécharde et al. (1992)
Enterococina A	<i>E. faecium</i>	Aymerich et al. (1996)
Divercina V41	<i>C. divergens</i>	Metivier et al. (1998)
Lactococina MMFII	<i>Lc. lactis</i>	Ferchini et al. (2001)
Lactococina G	<i>Lc. lactis</i>	Nissen-Meyer et al. (1992)
Lactococina M	<i>Lc. lactis</i>	van Belkum et al. (1991)
Lactacina F	<i>L. johnsonii</i>	Allison et al. (1994)
Plantaricina A	<i>L. plantarum</i>	Nissen-Meyer et al. (1993)
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	Jiménez-Díaz et al. (1995)
Plantaricina EF	<i>L. plantarum</i>	Anderssen et al. (1998)
Plantaricina JK	<i>L. plantarum</i>	Anderssen et al. (1998)
Acidocina B	<i>L. acidophilus</i>	Leer et al. (1995)
Carnobacteriocina A	<i>C. piscicola</i>	Worobo et al. (1994)
Divergicina	<i>C. divergens</i>	Worobo et al. (1995)
Enterococina P	<i>E. faecium</i>	Cintas et al. (1997)
Enterococina B	<i>E. faecium</i>	Nes y Holo (2000)
Helveticina J	<i>L. helveticus</i>	Joerger y Klaenhammer (1986)
Helveticina V-1829	<i>L. helveticus</i>	Vaughan et al. (1992)

Los mecanismos de actuación de las bacteriocinas son diversos. La mayoría actúan como bactericidas aunque se han descrito algunas, como la leucocina A-UAL187 (Hastings et al., 1991) o la leucocina S (Lewus et al., 1992) que actúan como bacteriostáticas. En ocasiones la actividad bactericida puede ir acompañada de la lisis celular del microorganismo sensible (bacteriocinas bacteriolíticas), y algunos autores sugieren que esta lisis podría deberse a la liberación de enzimas autolíticos que en condiciones normales están ligados electrostáticamente a los polímeros superficiales aniónicos de la pared celular (Jack et al., 1995).

Diversos estudios sugieren además que las bacteriocinas son proteínas activas a nivel de membrana cuyo mecanismo de acción primario es la formación de poros o canales iónicos en la membrana citoplasmática de las células sensibles (Abee, 1995).

Al igual que indicábamos para el peróxido de hidrógeno la capacidad bacteriocinogénica es una propiedad deseable en las cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores, por lo que se han descrito diversos métodos para su determinación. En todos los casos suele realizarse un estudio preliminar en medio sólido o semisólido, utilizando los que Hoover (1993) denomina métodos directos e indirectos, basándose en la descripción que de los mismos hacen Gratia, (1946) y Fredericq (1948), y un estudio de confirmación, cuyo objetivo es asegurar que la inhibición del crecimiento es debida a la producción de bacteriocinas y no a la de otros compuestos inhibidores.

Tanto en los métodos directos como en los indirectos, la actividad antimicrobiana del microorganismo productor se detecta como una inhibición del crecimiento de otro microorganismo denominado "indicador" (Tagg et al., 1976). En los directos, el microorganismo productor y el indicador se desarrollan simultáneamente bajo las mismas condiciones de incubación, y sólo se detectará inhibición si las sustancias antimicrobianas se sintetizan y liberan al medio durante los primeros estadios del crecimiento. En los indirectos, que son los más utilizados, el microorganismo productor se cultiva en un medio sólido durante un periodo determinado de tiempo, y a continuación el cultivo se cubre con una capa de medio semisólido fundido y atemperado que contiene el microorganismo indicador. Un ejemplo de estos es el denominado "spot test" o de la gota sobre

agar descrito por Fleming et al. (1975). Existen múltiples variantes de este método y así por ejemplo, algunos autores indican que es conveniente inactivar el microorganismo productor antes de añadir el indicador aplicando calor (Ahn y Stiles, 1990) o sustancias como el cloroformo (Davey y Richarson, 1981). Otros, añaden el microorganismo productor sobre membranas estériles depositadas sobre una capa de agar estéril y tras un periodo de incubación determinado, las retiran y depositan el microorganismo indicador diluido en un agar semisólido fundido y atemperado (Vlaemynck et al., 1994). Los ensayos indirectos son más sensibles que los directos y tienen la ventaja de que permiten que, tanto el microorganismo productor como el indicador, se desarrollen bajo condiciones óptimas de incubación (Tagg et al., 1976).

En el estudio de confirmación como indicábamos anteriormente, el microorganismo problema se cultiva en medio líquido bajo condiciones de incubación adecuadas y, seguidamente, tras eliminar las células del mismo se analiza la presencia de bacteriocinas en los sobrenadantes libres de células. También en este caso existen múltiples variantes, tanto en los procedimientos utilizados para la eliminación de las células de los cultivos (Mayr-Harting et al., 1972; Tagg et al., 1976; Jiménez-Díaz et al., 1995; Cintas et al., 1995) como en los utilizados para eliminar las sustancias interferentes (H_2O_2 , ácidos, etc.) (Daeschel et al., 1990; Vaughan et al., 1994; Cintas et al., 1995; Jiménez-Díaz et al., 1995). Algunos autores (Geis et al., 1983; Olasupo et al., 1994; Cintas et al., 1995) recomiendan la utilización de los sobrenadantes libres de células concentrados ya que facilita la observación de los resultados. Estos mismos autores proponen también algunos métodos como la liofilización, la ultrafiltración o la evaporación a vacío en rotavapor, para la concentración de estos sobrenadantes.

La evaluación de la actividad bacteriocinogénica de los sobrenadantes libres de células o de sus concentrados, se realiza mediante ensayos basados en la difusión tridimensional de las bacteriocinas en un medio sólido o semisólido y en la inhibición del crecimiento de los microorganismos indicadores. Los métodos más utilizados son modificaciones de la técnica de difusión en agar (agar well diffusion) descrita por Schillinger y Lücke (1989), en la cual se depositan alícuotas de los sobrenadantes a ensayar en pocillos practicados en una capa de agar semisólido, en la que previamente se ha inoculado el microorganismo indicador. Antes de

proceder a la incubación de las placas algunos autores (Cintas et al., 1995) aconsejan que éstas se mantengan unas horas en refrigeración para permitir la difusión de las bacteriocinas. Otros autores utilizan en lugar de pocillos discos de papel de filtro estériles impregnados con los sobrenadantes a ensayar a modo de antibiograma (Bhunia et al., 1988). En ambos casos la aparición de halos de inhibición del crecimiento, indicará la presencia de bacteriocinas en los sobrenadantes ensayados.

Para concluir, es importante resaltar que, a pesar de la enorme variedad de compuestos con actividad antimicrobiana que las BL son capaces de producir, es el efecto combinado de la competencia por los nutrientes del medio donde crecen y el descenso de pH del mismo causado por la producción de ácidos (láctico, acético y otros) el que, a criterio de algunos autores (Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990), ejerce la principal acción antimicrobiana.

2.5. MÉTODOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPADO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Tradicionalmente, la identificación microbiana ha estado basada en el estudio de caracteres fenotípicos, fisiológicos y/o bioquímicos. Estos métodos aunque presentan algunos inconvenientes, como por ejemplo su escaso poder discriminante (Kandler y Weiss, 1986) o el que son muy laboriosos y en ocasiones económicamente costosos, son todavía muy utilizados, aunque en ningún caso como único método de identificación. El avance y la simplificación de las técnicas moleculares han permitido que éstas se utilicen como una herramienta de rutina en la identificación de microorganismos, sobre todo en investigación, entre otras ventajas por su universalidad, sensibilidad, resolución y poder discriminante.

Los métodos utilizados en identificación y/o genotipado de bacterias pueden clasificarse en 3 grupos:

2.5.1. Métodos fenotípicos

El adjetivo fenotípico se refiere a todos aquellos métodos que analizan características que son expresadas por los microorganismos (Farber, 1996). La identificación fenotípica de un microorganismo es pues su asignación a un taxón

determinado por comparación de sus características (morfológicas, bioquímicas o fisiológicas) con las de los diferentes taxones de la clasificación. Las características a determinar y su número dependen tanto del tipo de microorganismo, como del conocimiento que del mismo se persiga, y hay que tener en consideración que, si bien individualmente analizadas no permiten establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos, si proporcionan una información descriptiva de gran interés y constituyen la base para la descripción formal de los taxa, desde familias y géneros hasta especies y subespecies. A pesar de ello, su escaso poder discriminante limita su uso en estudios de tipificación de cepas, especialmente en el grupo de bacterias que nos ocupa, por la heterogeneidad del mismo. Otro importante inconveniente de estos métodos es su escasa reproducibilidad, ya que algunos de estos caracteres pueden verse afectados, entre otros factores, por las condiciones de cultivo.

No obstante, a pesar de que por si solos resultan en ocasiones insuficientes para la correcta identificación de las especies, los métodos fenotípicos siguen en vigor y han sido ampliamente utilizados para la identificación de las bacterias lácticas (Schillinger y Lücke, 1987; Hugas et al., 1993; Samelis et al., 1994; Sánchez et al., 2000).

Algunos de estos métodos son:

- La *biotipificación* que consiste en la determinación de las actividades metabólicas o bioquímicas de los microorganismos frente a una variedad de sustratos, fermentación de azúcares, producción de enzimas, carácter homo o heterofermentativo, etc.

Para el estudio del perfil de fermentación de azúcares, los métodos más utilizados son los sistemas miniaturizados o tiras API (BioMérieux, Francia). La denominada API-50 CH es la que se utiliza para la identificación de las bacterias lácticas.

- El estudio de las características fisiológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, pHs, con diferentes concentraciones de NaCl, etc.

- La fagotipificación o determinación del perfil de fagos a los que es sensible la cepa en estudio, es un método con un gran poder de discriminación,

pero su utilización está limitada en gran parte por la falta de estandarización metodológica y de reactivos de alta calidad.

- La serotipificación, que estudia las propiedades antigénicas de las cepas. Su uso al igual que en el caso anterior está limitado por la falta de estandarización y de reactivos de calidad, además de que existen cepas no tipificables serológicamente.

- La antibiotipificación, que estudia los patrones de susceptibilidad a los antibióticos (antibiotipo). La capacidad de los microorganismos de modificar estos patrones como por ejemplo por pérdida de plásmidos, limita la utilización de este procedimiento.

La ventaja de la mayoría de estos métodos es la facilidad de realización, aunque algunos de ellos, como la fagotipia, no son realizables en todos los casos, y otros como el serotipado son altamente costosos.

El principal inconveniente de los marcadores fenotípicos, como se mencionaba anteriormente, es sin duda el que no son expresados de forma estable bajo diferentes condiciones ambientales o de cultivo, pero tienen además una importante limitación y es que no pueden ser utilizados en el caso de bacterias no cultivables.

2.5.2. Métodos físico-químicos

Los métodos físico-químicos utilizados en sistemática microbiana tienen como objetivo el estudio de determinados componentes químicos celulares, como los lípidos, los azúcares o las proteínas. Los más utilizados en la identificación de las BL son: la determinación de los perfiles de ácidos grasos totales, el análisis de las peptidoglucan-hidrolasas y las determinaciones del espectro infrarrojo mediante la transformada de Fourier y de los perfiles de proteínas totales (Curk-Daubié, 2000).

a) Perfiles de ácidos grasos totales

El análisis de los ácidos grasos totales por cromatografía en fase gaseosa, tras la extracción, saponificación y esterificación de los mismos, es un método rápido, sensible y selectivo que permite la identificación de un elevado número de

especies microbianas, aunque no siempre permite la diferenciación de cepas. La identificación se realiza comparando el perfil cromatográfico obtenido con aquellos de una base de datos, pero a menudo para llegar a la identificación a nivel de especie, no es suficiente con realizar un análisis cualitativo de los resultados, y es necesario un análisis cuantitativo. Dado que la composición en ácidos grasos puede variar en función de algunos factores como el aporte nutricional, la temperatura de incubación, la aireación y la edad del cultivo, es de gran importancia fijar y estandarizar de manera muy rigurosa las condiciones de cultivo de los microorganismos que se vayan a analizar.

Decallone et al. (1991) y Gilarova et al. (1994) describen la aplicación de este método para la identificación de bacterias lácticas y Rizzo et al. (1987) lo utilizan para la identificación de algunas especies de *Lactobacillus*.

b) Análisis de las peptidoglucan-hidrolasas

Estas son enzimas endógenas de la pared celular bacteriana muy bien conservadas a nivel de especie. A menudo varias de estas peptidoglucan-hidrolasas (PG-hidrolasas) con especificidades distintas coexisten en la pared celular. Su análisis puede efectuarse fácilmente empleando el método del zimograma, tras efectuar una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas totales. En éste, las proteínas una vez separadas en la electroforesis se renaturalizan y el gel se incuba con otro que contiene el sustrato del enzima (paredes celulares de *Micrococcus luteus*). Tras la incubación se observan bandas fácilmente visibles producidas por la hidrólisis del sustrato que se corresponden con las PG-hidrolasas (Leclerc y Asselin, 1989). Este método ha sido puesto a punto, patentado y utilizado para la identificación de algunas especies de *Lactobacillus* por Lortal et al. (1997b).

c) Espectro infrarrojo mediante la transformada de Fourier (IR-TF)

Este es uno de los métodos físico-químicos más prometedores en tareas de identificación (Allouch et al., 1998), ya que puede realizarse a partir de una colonia aislada sin necesidad de subcultivos. Las propiedades de absorción de las células bacterianas enteras en el infrarrojo mediano ($4000-600\text{ cm}^{-1}$), puede constituir un método de identificación, ya que cada individuo posee un espectro IR-TF específico y reproducible, como si de una "huella dactilar" se tratara (Naumann et al., 1991).

Estos autores indican que para ciertas especies, cada espectro corresponde a un serotipo y/o cepa. Los espectros corresponden a las propiedades vibratorias de todos los constituyentes celulares. El espectro puede descomponerse por métodos matemáticos en bandas diferentes debido a las vibraciones de las uniones químicas características, pudiendo obtenerse así la máxima información de los mismos. Tras su lectura, el espectro puede ser digitalizado y comparado con los espectros de referencia de las bases de datos, empleando programas informáticos tipo Circuito de Neuronas (Coustere y Fertil, 1992). Goodacre et al. (1996) emplearon este método para la identificación rápida de algunos estreptococos y enterococos, y Naumann et al. (1991) demostraron que, para ciertas especies, cada espectro corresponde a un serotipo y/o cepa.

d) Perfiles de proteínas totales

La expresión del genoma de una célula microbiana resulta en la síntesis de diversas proteínas pudiendo por tanto considerarse que éstas son una copia “indirecta” del mismo, razón por la que el análisis del perfil de proteínas ha sido utilizado en tareas de caracterización, clasificación e identificación microbiana. La separación de una mezcla de proteínas celulares totales en un gel mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), origina un perfil complejo que puede también considerarse como una “huella dactilar” (fingerprint) del microorganismo que está siendo analizado. El inconveniente de esta técnica es que con frecuencia ocurre que cepas bacterianas de una misma especie o de especies muy próximas presentan perfiles proteicos poco diferenciables. Esta técnica ha sido utilizada con éxito para la identificación de algunas especies de BL (Dicks y Van Vuuren, 1987; Dykes y Von Holy, 1993; Pot et al., 1993 y 1994; Vogel et al., 1994; Samelis et al., 1995; Sánchez et al., 2003).

2.5.3. Métodos moleculares

El análisis de la secuencia de bases de los ácidos nucleicos es un marcador genético que puede ser utilizado para la diferenciación de especies y cepas. En estos ensayos se utiliza bien el genoma entero, como en el caso de las hibridaciones ADN/ADN, o una parte del mismo, como ocurre en la secuenciación de los ARNs ribosomales.

Para la aplicación de algunas de estas metodologías es necesario conocer las secuencias de ciertos genes y para ello existen bancos de datos, accesibles a través de Internet, que ofrecen todas las secuencias de genes conocidas, puntualmente actualizadas. Algunos de estos son el EMBL, el GenBank, el GDB o el TIRR cuyas direcciones de Internet se recogen en la bibliografía de esta memoria.

Los métodos moleculares más utilizados en la identificación y/o genotipado de las BL son:

a) Secuenciación de los genes codificantes del ARN ribosómico

Los ácidos ribonucleicos ribosómicos (ARNr) son una herramienta casi ideal para el estudio de la evolución y del parentesco microbiano, ya que su secuencia, debido a su papel crítico y constante en el ribosoma, se mantiene muy conservada durante la evolución. Los ARNr poseen secuencias variables y secuencias constantes, que pueden ser utilizadas para comparar tanto microorganismos muy próximos como muy alejados filogenéticamente.

Las bacterias poseen tres tipos de ARNr, designados por su coeficiente de sedimentación, 23S, 16S y 5S, cuyos genes se encuentran normalmente organizados en un operón y separados entre sí por secuencias intergénicas llamadas ITS (internal transcribed spacer). La fracción 16S del ARN ha sido la más estudiada ya que su tamaño permite una secuenciación rápida y suministra además mucha información. Actualmente se dispone de numerosas secuencias del ARNr 16S en las bases de datos mundiales. Un microorganismo desconocido puede ser identificado en función del alineamiento de la secuencia de su ARNr 16S con las secuencias disponibles en estas bases de datos. Para especies de un mismo género existe un alineamiento en las secuencias superior al 90% y para cepas de una misma especie este valor es superior al 99% (Betz et al., 1990). Este método ha sido utilizado para establecer la filogenia del género *Lactobacillus* y géneros asociados (Collins et al., 1991), y para identificar cepas de *Lactobacillus* (Nissen y Dainty, 1995; Cocconcelli et al., 1997).

b) Estudio de los perfiles plasmídicos

Los plásmidos son elementos extracromosómicos de ADN generalmente circulares, de doble cadena, superenrollados, autoreplicantes y de muy diversos tamaños, que son muy frecuentes entre los lactococos y los lactobacilos.

En la aplicación más básica de la técnica de tipado de plásmidos, éstos deben ser extraídos y separados por electroforesis en geles de agarosa para determinar su número y tamaño. Las principales desventajas de esta técnica son 1) la inestabilidad de los perfiles, ya que los plásmidos pueden perderse, total o parcialmente, o pasar de una célula a otra por conjugación, y 2) el que su aplicación está supeditada a que la especie posea estos elementos (Vescovo et al., 1992; O'Sullivan y Klaenhammer, 1993; Farber, 1996).

El análisis de los perfiles plasmídicos ha sido utilizado con éxito en la monitorización de cultivos iniciadores de BL en embutidos (Garriga et al., 1996) y en encurtidos (Ruiz-Barba et al., 1994), aunque en todos los casos los autores indican que la posible pérdida de alguno de los plásmidos durante la fermentación complica la interpretación de los resultados.

c) Hibridación ADN/ADN

Es el método reconocido para la definición de nuevas especies, entendidas éstas como un grupo de hibridación ADN/ADN.

El método consiste en la desnaturalización del ADN genómico de las cepas en estudio (A y B) y posterior renaturalización de la mezcla. La formación del heteroduplex A-B será proporcional a la semejanza existente entre los dos genomas, calculándose un % de reasociación. Esta hibridación sólo permite identificaciones a nivel de especie o subespecie y, a pesar de ser el método de referencia, es tan complejo y largo que no se emplea de forma rutinaria. Todas las especies pertenecientes a los distintos géneros de bacterias lácticas han sido estudiadas y comparadas por este método (Schleifer et al., 1995).

d) Hibridación con sondas

Una sonda es una cadena de ácido nucleico capaz de hibridar con otro que posea exactamente la secuencia nucleotídica complementaria. Estas sondas

pueden ser tanto de ADN como de ARN, empleándose de muy diversas formas. Así, las de ADN, pueden hibridar sobre una colonia directamente (Dot-Blot, hibridación "in situ") o sobre ADNs previamente separados por electroforesis (Southern blot).

Si la sonda se prepara a partir del ADN de una cepa patrón conocida, esta técnica podrá ser utilizada para identificar cepas bacterianas desconocidas. Cuando la sonda es un fragmento de un gen específico, la hibridación permitirá identificar cepas bacterianas poseedoras de ese gen, y cuando contiene secuencias de los ARNr 16S, 23S o ITS, se podrá realizar la clasificación taxonómica de una cepa desconocida (Farber, 1996) hasta el nivel de especie, en función de cual sea la secuencia elegida.

La tecnología **FISH** (hibridación fluorescente "in situ") utiliza sondas de ARN unidas a colorantes fluorescentes. En ésta, las células son tratadas con reactivos apropiados que permeabilizan sus membranas lo que permite la penetración de la mezcla sonda/colorante. Cuando la sonda hibrida con el ARN ribosómico las células se aparecen uniformemente fluorescentes y pueden ser observadas con un microscopio de fluorescencia.

Esta técnica se está utilizando con éxito en estudios ecológicos de comunidades microbianas, ya que permite la observación directa de los microorganismos en su ambiente, sin necesidad de realizar un cultivo previo, lo que supone un ahorro importante de tiempo y evita el problema de la no detección de los microorganismos no cultivables (Kleikemper et al., 2002).

Para la identificación de BL aisladas de alimentos fermentados se ha utilizado tanto el método del Dot-Blot inverso con sondas preparadas a partir de secuencias de las fracciones 16S y 23S del ARNr (Ehrmann et al., 1994) como la tecnología FISH (Matte-Tailliez et al., 2001; Blasco et al., 2003).

e) SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism)

Esta técnica consiste en la desnaturalización térmica del ADN, en condiciones que no permitan una nueva reasociación, de forma que las dos cadenas separadas acabarán plegándose sobre si mismas hasta adquirir su conformación más estable. Las conformaciones resultantes serán diferentes para

cada microorganismo y podrán ser separadas mediante electroforesis capilar. Aunque esta técnica se ha utilizado habitualmente para estudiar polimorfismos génicos, en estudios recientes de dinámicas de poblaciones se ha aplicado para la identificación de especies de BL en quesos (Duthoit et al., 2003).

f) Métodos basados en el polimorfismo de restricción

Estos métodos tienen como fundamento la digestión del ADN con enzimas de restricción específicas que generan fragmentos de distintos tamaños, que posteriormente son separados por electroforesis y visualizados.

Las enzimas de restricción reconocen secuencias de ADN muy concretas, que suelen tener una longitud de entre 4 y 7 nucleótidos y cortan la doble cadena de ADN en el lugar de reconocimiento. Si el enzima elegido para el análisis corta en pocos puntos el ADN objeto de estudio, los fragmentos obtenidos serán de gran tamaño, en cuyo caso para su separación será necesario utilizar la denominada electroforesis en campo pulsado o Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Björkroth et al., 1996). En esta técnica, el campo eléctrico aplicado cambia de dirección alternativamente lo que obliga a los fragmentos de ADN a reorientarse después de cada cambio, lo que les permite avanzar. El perfil o “pattern” de fragmentos de ADN obtenidos tras la restricción con diferentes enzimas y posterior separación mediante PFGE, es considerado como una “huella genética” de las cepas estudiadas.

Este método ha sido descrito como el más discriminante a nivel intraespecífico de los utilizados para el genotipado de las BL, teniendo además una buena reproducibilidad, si bien es laborioso y caro lo que limita su aplicación cuando se trata de analizar un elevado número de muestras (Farber, 1996; Tynkkynen et al., 1999). Ha sido utilizado en la caracterización de cepas de *Lc. lactis* (Le Bourgeois et al., 1989), *L. helveticus* (Lortal et al., 1997a) y *L. sakei* (Björkroth et al., 1996) entre otras, para la caracterización de la microbiota láctica aislada de la fermentación de encurtidos (Sánchez et al., 2004) y para monitorizar fermentaciones dirigidas de embutidos y quesos (Zhang y Holley, 1999; Blaiotta et al., 2001).

En el caso del ribotipaje, lo que se realiza es un perfil de restricción de los genes que codifican los ARNr, para posteriormente transferirlos a una membrana de nitrocelulosa o nylon donde se realiza la hibridación mediante Southern blot (Rodtong y Tannock, 1993). El número y tamaño de las bandas será variable entre cepas, por lo que puede emplearse tanto para identificación a nivel de especie como para la separación de cepas dentro de una misma especie. Esta técnica ha sido utilizada para la diferenciación de especies de *Lactobacillus* (Rodtong y Tannock, 1993) y para caracterizar cepas industriales de lactococos (Rodrigues et al., 1991) y bifidobacterias (Mangin et al., 1994; Mangin et al., 1996).

El uso de varias enzimas de restricción aumenta en ambos casos, el poder de discriminación pero también multiplica el trabajo y dificulta el análisis de los perfiles (Persing et al., 1993).

g) Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1983 Kary Mullis junto con un equipo de científicos de la Corporación Cetus (Perkin-Elmer Cetus Corporation, Norwalk CT) desarrollaron un proceso conceptualmente simple para amplificar o incrementar el número de copias de fragmentos específicos de un ácido nucleico, presentes en una muestra. Este proceso denominado "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR (Polymerase Chain Reaction), fue posteriormente desarrollado y automatizado y en el año 1989 recibió la consideración de "el mayor desarrollo científico del año" y la Taq polimerasa, enzima empleada en el mismo, la de "molécula del año" (Guyer y Koshland, 1989). En el año 1993, Kary Mullis recibiría el premio Nobel de Química por el desarrollo de dicha técnica.

La PCR es un método de síntesis enzimática de ADN in vitro, que permite obtener múltiples copias de un segmento de ADN predeterminado a partir de: 1) cebadores o "primers" que son secuencias de oligonucleótidos que hibridan en las cadenas complementarias del ADN que actúa como molde, flanqueando el fragmento que va a ser amplificado, 2) la Taq ADN polimerasa, enzima termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que cataliza la elongación de dichos oligonucleótidos en la dirección 5' → 3' utilizando para ello 3) los cuatro

desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que son añadidos en exceso en la mezcla de reacción.

La secuencia de los cebadores utilizados puede ser aquella de un gen conocido, o bien la correspondiente a regiones variables de los ARNr 16S y 23S o de las regiones intergénicas (ITS) de una especie bacteriana (PCRs específicas) o por el contrario tratarse de una secuencia arbitraria, como ocurre en la técnica denominada Randomly Amplified Polymorphic DNA o RAPD que describiremos más tarde.

En cada ciclo de PCR ocurren las siguientes etapas (Figura 4):

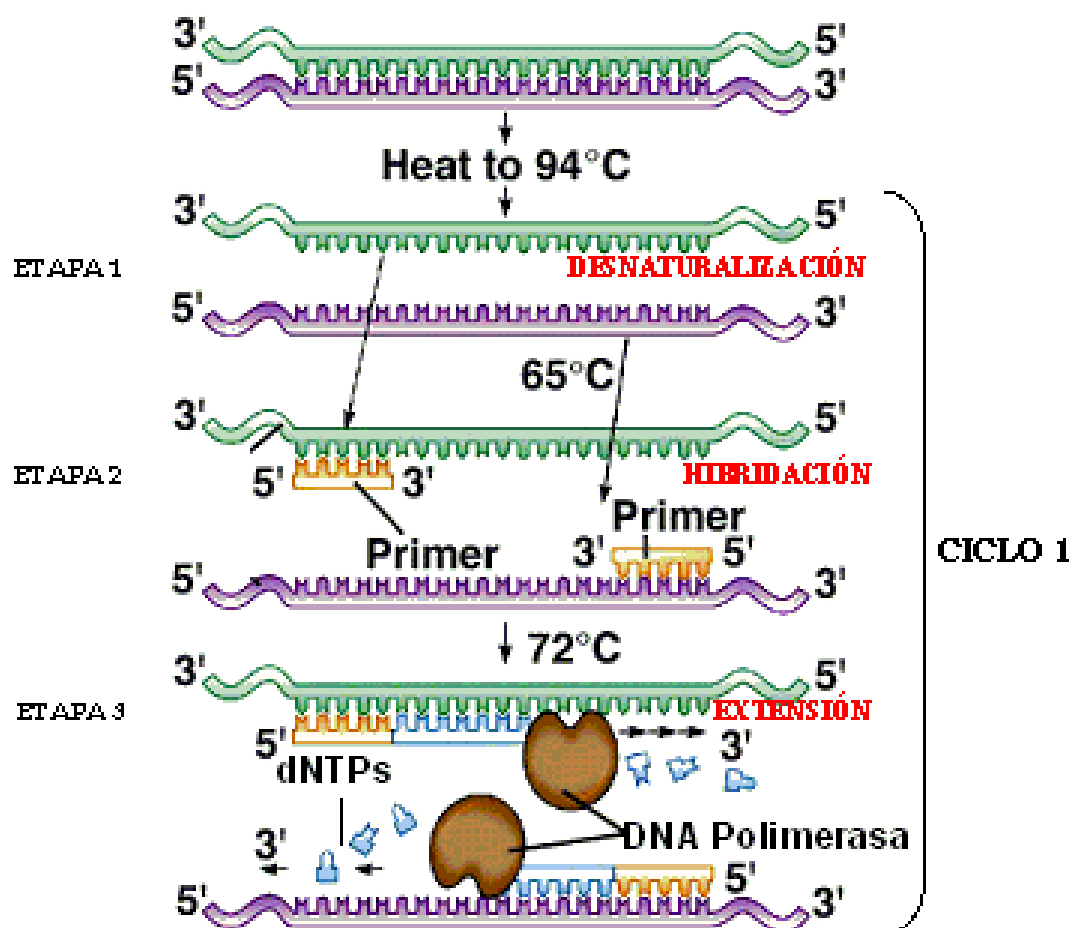


FIGURA 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Etapa 1, es aquella en la que se produce la desnaturalización por calor del ADN bicatenario diana o molde.

Etapa 2, es una etapa de enfriamiento posterior que permite el reconocimiento del cebador y su acoplamiento con el ADN molde (anillado o hibridación). En esta es necesario que exista un exceso de cebador en relación al ADN molde para asegurar de esta forma que la mayor parte de las cadenas diana hibriden con cebadores y no entre sí.

Etapa 3, es la de extensión del cebador por acción de la Taq ADN polimerasa, que utiliza las cadenas diana del ADN como moldes.

Como cada hebra de ADN recién sintetizada sirve de molde para las reacciones siguientes, repitiendo los ciclos de desnaturalización-hibridación-elongación se logrará amplificar de modo exponencial el fragmento delimitado por los cebadores. En la práctica suelen realizarse unos 20-30 ciclos, con los que se consigue un incremento de unas 10^6 - 10^{11} veces la cantidad inicial de ADN (Giovannoni, 1991; Swaminathan y Matar, 1993; Persing, 1993). El principal inconveniente de esta técnica es que es muy susceptible de contaminación con ADN extraño.

El carácter altamente repetitivo del proceso ha permitido además su automatización y la comercialización de equipos programables (termocicladores) donde llevarlo a cabo y puede afirmarse que es actualmente el método más utilizado en muchos campos de investigación científica. En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que describen las secuencias de cebadores específicos para algunas especies de BL como *L. plantarum* (Quere et al., 1997; Torriani et al., 2001), *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* y *L. acidophilus* (Drake et al., 1996), *L. curvatus* y *L. sakei* (Aymerich et al., 2003), *Oenococcus oeni* (Zapparoli et al., 1998), *L. brevis* (Guarneri et al., 2001) y muchas otras.

Actualmente se está trabajando en el desarrollo de protocolos para llevar a cabo reacciones de PCR cuantitativas a tiempo real, que no sólo detecten la presencia de determinadas especies, sino también que sean capaces de cuantificarlas (Furet et al., 2004; Pinzani et al., 2004).

Además de la PCR propiamente dicha, existen otras técnicas de identificación y genotipado basadas en la PCR, que pueden ser utilizadas tanto en el genotipado de BL como en la monitorización de fermentaciones dirigidas. Una de ellas es la **Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**, que fue descrita por primera vez por Williams et al. (1990). En esta se produce una amplificación aleatoria del ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa de PCR con cebadores inespecíficos, de secuencia arbitraria y de tamaño corto (10-20 nucleótidos). La utilización de estos cebadores cortos, comparados con los de la PCR tradicional, permite trabajar con temperaturas de hibridación más bajas, lo que facilita que el cebador hibride en lugares para los cuales el emparejamiento no es perfecto, lo que a su vez aumenta la probabilidad de que se anille en distintos lugares del genoma. Si algunos de estos sitios de unión están orientados de manera opuesta o palindrómica en el ADN molde, y lo suficientemente cercanos como para permitir la amplificación, se generará un producto en la reacción de PCR.

En una reacción de RAPD se generan por tanto numerosos fragmentos de amplificación de diferentes longitudes nucleotídicas con diferentes pesos moleculares, que al ser sometidos a una electroforesis convencional en geles de agarosa se separan, obteniéndose un patrón de bandas ("RAPD-fingerprint" o huella RAPD) específico de cada cepa.

Williams et al. (1990) destacaron como principal ventaja de esta técnica el que no requiere un conocimiento previo de la secuencia a amplificar, ni de la bioquímica y biología de las especies objeto de estudio, ya que los cebadores que utiliza se unen al genoma bacteriano al azar, obteniéndose perfiles con cualquier cepa.

La técnica RAPD presenta otras ventajas:

- Es rápida y metodológicamente sencilla ya que no requiere ningún tratamiento o preparación previa de la muestra.
- Pueden utilizarse un conjunto de cebadores "universales" para el análisis genómico de una amplia variedad de especies.

Aunque la utilización de esta técnica se está extendiendo por sus ventajas, hay constantes referencias al hecho de que la reproducibilidad inter- e incluso intra-laboratorios se hace casi imposible, por la importancia que en la misma tienen el tipo de Taq polimerasa y/o el termociclador utilizados en la reacción de PCR. Pero estos no son los únicos factores que pueden influir en los resultados, otros como la concentración de magnesio y algunas sales, el tipo, la composición y la pureza del cebador, así como su longitud o la temperatura de hibridación, son también muy importantes. Por todo ello, es esencial que las condiciones del análisis sean cuidadosamente controladas, para lograr así una buena reproducibilidad.

La RAPD ha sido utilizada con éxito en estudios de biodiversidad genética en productos lácteos (Quiberoni et al., 1998; Mora et al., 2000; Marcellino et al., 2001; Brennan et al., 2002) y en encurtidos (Sánchez et al., 2004), para el tipado de bacterias lácticas (Cocconcelli et al., 1995; Du Plessis y Dicks, 1995; Johansson et al., 1995a; Björkroth et al., 1996) y en la monitorización de procesos como la fermentación cárnica (Veyrat et al., 1999) o la fermentación de "sauerkraut" (Plengvidhya et al., 1994). Además, se ha demostrado su eficacia como técnica de identificación cuando se incluyen en los ensayos cepas de referencia con las que establecer comparaciones (Ben Omar et al., 2004; Sánchez et al., 2004).

Otras técnicas basadas en la reacción de PCR son la electroforesis en gradiente de desnaturalización (DGGE) y la electroforesis en gradiente de temperatura (TGGE) del amplificado del ADN ribosómico (ADNr) 16S. Ambas han demostrado ser útiles y adecuadas para la caracterización de comunidades microbianas procedentes de una gran variedad de nichos ambientales (agua marina, suelos, cuevas, etc.) y se han aplicado en estudios de diversidad de BL en algunos ecosistemas alimentarios (Ampe et al., 1999; Ben Omar y Ampe, 2000, Cocolin et al., 2001 y 2004). Tienen entre sus ventajas el que permiten 1) la determinación de las especies integrantes de una comunidad microbiana y el conocimiento de los cambios que en la misma puedan producirse a lo largo del tiempo (Pintado et al., 2003) y 2) la detección rápida y relativamente económica de cualquier especie, incluso las no cultivables (Giraffa, 2004).

En éstas se extrae el ADN total de la muestra en estudio, amplificándose a continuación una región del ARNr 16S con una secuencia de bases nucleotídicas

hipervariable, mediante una reacción de PCR. La mezcla de amplificados resultante es sometida a un gradiente de desnaturalización, de urea o formamida (DGGE) o de temperaturas (TGGE), en un gel de poliacrilamida para conseguir su separación. Se obtiene así el patrón de bandas o “patrón genético” correspondiente a las poblaciones mayoritarias de la comunidad analizada. Las bandas pueden ser posteriormente secuenciadas, lo que permitirá establecer relaciones filogenéticas o la identificación de los diferentes microorganismos por comparación de éstas secuencias.

Otra técnica también basada en la reacción de PCR, es la denominada ARDRA (Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado por PCR). En ésta, primero se amplifica el ADNr 16S y a continuación se corta con enzimas de restricción obteniéndose tras su separación en un gel de agarosa, un perfil característico de la especie. Se ha utilizado con éxito para identificar aislados de *Lactobacillus* obtenidos en muestras de mosto y vino (Rodas et al., 2003 y 2005), así como para monitorizar cultivos iniciadores (Roy et al., 2001).

En la Figura 5 se muestran los métodos fenotípicos, físico-químicos y moleculares que pueden ser utilizados en estudios taxonómicos y en el tipado de bacterias, indicándose en cada caso su nivel de discriminación.

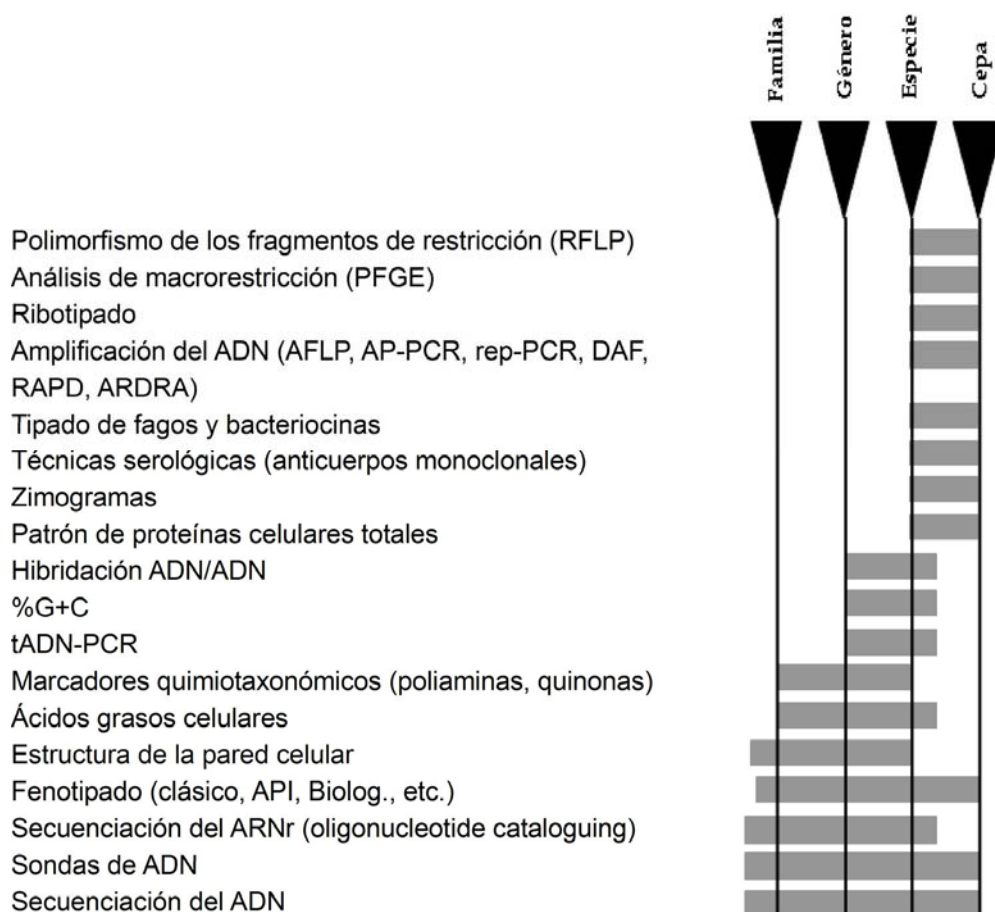


FIGURA 5. Métodos utilizados en el análisis taxonómico de bacterias (Fuente: Vandamme et al., 1996). PFGE: Electroforesis de campo pulsado; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; AFLP: Fragmentos amplificados de tamaño polimórfico; AP-PCR: PCR con oligonucleótidos arbitrarios; rep-PCR: PCR de elementos repetitivos; DAF: Huellas dactilares por amplificación de ADN; RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar; ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado por PCR

2.6. APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las innumerables investigaciones llevadas a cabo sobre la fisiología y la genética del grupo de las bacterias lácticas han hecho posible un conocimiento muy profundo de las mismas y en algunos aspectos ha sido posible comprender cómo funciona este grupo de bacterias relativamente "simples" (Konings et al., 2000).

El conocimiento adquirido ha permitido asimismo mejorar e innovar las aplicaciones de estos microorganismos en el campo de las fermentaciones industriales, del bioprocesado, la agricultura, la alimentación y la nutrición y más recientemente de la medicina (Steidler et al., 1998). En los últimos años han sido además utilizadas en investigación básica como modelo de bacterias Gram-positivas en diversos estudios fisiológicos y genéticos (Konings et al., 2000). Hace relativamente poco tiempo que se ha conseguido la secuenciación del genoma completo de una bacteria láctica, la cepa IL 1403 de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Bolotin et al., 2001), y actualmente se está realizando la secuenciación de algunas otras cepas.

En la industria, son muchas las aplicaciones de las BL pero quizás, y aún a pesar de su antigüedad, la más importante sigue siendo su utilización como **cultivos iniciadores**. Como indicábamos al inicio de esta Introducción, las BL fueron uno de los primeros microorganismos empleados en la elaboración de alimentos y actualmente son los más utilizados en las fermentaciones alimentarias. Una muestra de la gran variedad y riqueza de alimentos obtenidos con participación de bacterias lácticas se recoge en la Tabla 5.

Entre las aplicaciones más novedosas en este campo cabe destacar su utilización en la fermentación de cereales, por su capacidad para hidrolizar el gluten (principal proteína de los cereales panificables) y los fitatos principal factor antinutricional presente en los cereales y en los vegetales, lo que evita la aparición de reacciones alérgicas.

Otro de los usos más importantes y actuales de las BL es como **probióticos**. Los probióticos han sido definidos por Guarner y Schaafsma (1998) como “microorganismos vivos, no patógenos que, ingeridos en determinado número, ejercen efectos saludables, más allá de los inherentes a la nutrición básica”. Es bien sabido que las BL son huéspedes habituales del tracto gastrointestinal de humanos y animales, donde contribuyen a las complejas interacciones entre la microbiota intestinal y el hospedador, actuando de forma beneficiosa en la fisiología del hospedador y en su sistema inmune. Esto hace mejorar el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal del hospedador motivos por los que las BL

están siendo utilizadas como prebióticos (Donohue et al., 1998; Salminen et al., 1998; Naidu et al., 1999).

TABLA 5. Bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores en la industria alimentaria
(Fuente: Leroy y De Vuyst, 2004)

Alimento fermentado	Especie utilizada como cultivo iniciador
Quesos	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Mantequilla	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yogurt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Leches fermentadas	<i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Kefir	<i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofacies</i> , <i>L. brevis</i>
Embutidos europeos	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i>
Embutidos americanos	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Pescados fermentados	<i>L. alimentarius</i> , <i>C. piscicola</i>
Sauerkraut	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
Aceitunas	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i>
Encurtidos	<i>Ln. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>
Cereales fermentados	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>W. cibaria</i>
Vino	<i>O. oeni</i>
Sake	<i>L. sakei</i>

Como probióticos, las BL han demostrado que pueden producir efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento clínico de diarreas (Heyman y Ménard, 2002), en la mejora de la digestión de la lactosa en individuos deficientes en lactasa (Mustapha et al., 1997), en la prevención y tratamiento de ciertas alergias y

enfermedades inflamatorias del intestino, en la modulación de los mecanismos inmunitarios a nivel de las mucosas, en el aumento de la capacidad de los linfocitos para producir diversas citoquinas o en el tratamiento de la hipercolesterolemia, entre otros (Salminen et al., 1998).

Los géneros de BL más utilizados y estudiados como probióticos son: *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* y las preparaciones comerciales disponibles contienen con mucha frecuencia las especies *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. reuteri* y *L. johnsonii*.

La demanda creciente de los consumidores, cada día más preocupados por la salud, es la razón por la que el mercado internacional de estos productos no ha dejado de incrementarse en los últimos años.

Otra de las aplicaciones de las BL es en la **producción industrial de diversos productos** como el ácido láctico, el etanol, biopolímeros como los dextranos, o las bacteriocinas. Así por ejemplo, en los últimos años se ha incrementado de manera notable el uso de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos (EPS) como *Ln. mesenteroides*, especie capaz de producir dextranos en medios hipersacarados, en la elaboración de algunos productos lácteos fermentados, yogures batidos y descremados o quesos de bajo contenido graso. La presencia de estos polímeros naturales aumenta la viscosidad, mejora la textura y evita el desuerado y por consiguiente hace innecesario el uso de agentes viscosizantes o texturizantes artificiales, obteniéndose alimentos 100% naturales. Algunos de estos biopolímeros tienen además importantes propiedades probióticas y/o prebióticas.

Las **bacteriocinas** son también importantes productos de interés como conservantes, si bien su utilización está supeditada a la modificación de la legislación vigente. La nisina es la única cuya utilización como conservante alimentario está autorizada actualmente.

Por último, merece ser mencionada una de las aplicaciones más innovadoras que es su utilización como **vehículo oral para vacunas**. Características de las BL tales como, su carácter “amigable” con la flora de la mucosa gastrointestinal y vaginal, su carácter no invasivo, la capacidad para permanecer

viabiles en el organismo un tiempo adecuado (10-15 días) y la de ser capaces de llegar a distintos lugares en el organismo, las convierten en un vehículo ideal para expresar o liberar antígenos y/o proteínas terapéuticas en los lugares más recónditos del organismo. Algunos autores (Salminen et al., 1998; Naidu et al., 1999) han estudiado su utilización como vehículo para la inmunización oral contra microorganismos patógenos.

3. LOS ENCURTIDOS

Los encurtidos son “hortalizas y verduras a las que se adiciona sal, que pueden sufrir o no un proceso de fermentación láctica y que se conservan en vinagre”, quedando excluidos de esta definición aquellos cuyo pH sea superior a 4,5. Además del vinagre, que es el ingrediente esencial, el líquido de gobierno puede tener otros componentes como azúcar, hierbas aromatizantes o ajo, dependiendo del tipo de producto y de su elaboración (Rodrigo y Martínez, 1991). Por sus características organolépticas son un complemento ideal de ensaladas siendo consumidos habitualmente como aperitivo.

La mayoría de los vegetales han sido o pueden ser conservados por fermentación, pero los más conocidos son las aceitunas, de las que España es el primer productor, los pepinillos y la col ácida y, en menor grado otros muchos como las alcaparras, las cebolletas, las zanahorias, la coliflor o las berenjenas. En el mercado existen actualmente una gran variedad de preparados que hacen las delicias de los consumidores.

La técnica de conservación de alimentos por salado y fermentación es muy antigua y aunque actualmente existen otras más modernas, se mantiene no tanto como sistema de conservación sino por otros interesantes motivos, como por ejemplo porque:

- Proporciona al producto cualidades organolépticas muy apreciadas
- Requiere en comparación con otros métodos de conservación (ultracongelación, deshidratación...) un bajo coste en instalaciones y un menor consumo energético

- La acción de las bacterias lácticas aporta nutrientes adicionales
- Se trata de alimentos “seguros” en los que el riesgo de intoxicación por consumo es prácticamente inexistente.

La técnica tradicional de fermentación de vegetales, es un tanto empírica siendo la microbiota epifítica de los frutos la que lleva a cabo la fermentación espontánea de los azúcares que procedentes de los frutos, se encuentran en la salmuera. El tipo de sustrato a fermentar y las condiciones ambientales son en este caso las que seleccionan los microorganismos que llevarán a cabo el proceso (Rodrigo et al., 1969).

En general, este proceso tiene distintas fases o etapas:

- Fase de acondicionamiento en ésta se llevan a cabo todas las operaciones previas necesarias para acondicionar los frutos (lavado, pelado, calibrado, etc.), que serán distintas en cada caso.
- Fase de fermentación que puede o no realizarse, dependiendo del producto que se elabore.
- Fase de elaboración propiamente dicha que es aquella en la que el producto obtenido es envasado en un líquido de gobierno adecuado para su comercialización.

3.1. LA BERENJENA DE ALMAGRO

La Berenjena de Almagro es un encurtido tradicionalmente elaborado en la provincia de Ciudad Real (Castilla-La Mancha, España) en la zona de Almagro y colindantes, para el que se utiliza como materia prima una variedad de berenjena autóctona, *Solanum melongena* L. var. *esculentum depressum* o Almagro. Esta variedad es el resultado de la selección efectuada por los propios agricultores, caracterizándose por su pequeño tamaño, las hojas del cáliz recubren prácticamente el fruto, y por su color verde amarillento.

En el año 1994 (Orden 15 de Julio 1994. D.O.C.M. Nº 36, 1994) se crea el Consejo Regulador de la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Berenjena de Almagro”, cuyo Reglamento (CE nº 2400/96) fue publicado en el Diario Oficial de

la Comunidad Europea en el año 1996 (nº L327 p. 11 18-12-1996), siendo por tanto una de las primeras hortalizas españolas en alcanzar este reconocimiento.

Según los datos proporcionados por este Consejo Regulador, en el año 2004 se comercializaron 1400 Tm de Berenjenas acogidas a esta IGP lo que proporcionó unos beneficios de 3,47 millones de euros. Es de destacar el hecho de que en los últimos 5 años se ha duplicado la producción, lo que da idea de la importancia que este producto tiene para la región.

3.1.1. Vínculo con el medio

a) Histórico

El cultivo de la berenjena procede según diversos estudios, de zonas subtropicales, tropicales y asiáticas, tales como la India, China o Birmania. A través de la ruta de la seda y de la mano de los árabes, auténticos especialistas en la elaboración de platos y conservas con hortalizas, la berenjena habría emigrado hacia occidente. Es en el mundo musulmán, donde la berenjena adquiere su importancia y su nombre, que deriva del árabe “albadinjan”, término ya citado en el siglo X en el Calendario de Córdoba de Arib. Su cultivo en la península ibérica se remonta a la época de la dominación árabe desde donde la berenjena se habría difundido lentamente a otros países europeos y a América. Son numerosas las referencias a la berenjena tanto en la literatura clásica como en el habla popular, incluso Cervantes la nombra en su universal novela “Don Quijote de la Mancha” poniendo en boca de Sancho: “He oído decir que los moros son amigos de las berenjenas...”.

La Berenjena de Almagro es un producto consumido de forma habitual como aperitivo, cuyo aliño artesanal con vinagre, aceite vegetal, sal común, comino, ajo, pimentón y agua, se practica desde tiempos remotos. A principios de siglo los lugareños compraban las berenjenas a sus cultivadores en la época de recogida y las envasaban en orzas vidriadas, variando la composición del aliño en función del tiempo previsto de consumo. Eran muchas las casas en las que se aliñaban berenjenas, y aunque la fórmula era sobradamente conocida, existían especialistas en dar el “punto” de aliño, que eran muy solicitados. Con el tiempo, su elaboración ha pasado de la artesanía familiar a la pequeña industria.

b) Natural

Zona geográfica: La superficie territorial amparada por la IGP “Berenjena de Almagro” es de 108.616 hectáreas y engloba seis términos municipales situados en el corazón de la Mancha y pertenecientes a la Comarca del Campo de Calatrava en Ciudad Real: Aldea del Rey, Almagro, Bolaños de Calatrava, Calzada de Calatrava, Granátula de Calatrava y Valenzuela de Calatrava.

En esta zona es donde tradicionalmente se ha elaborado la Berenjena aliñada y es de una de estas localidades, Almagro, de donde toma su nombre.

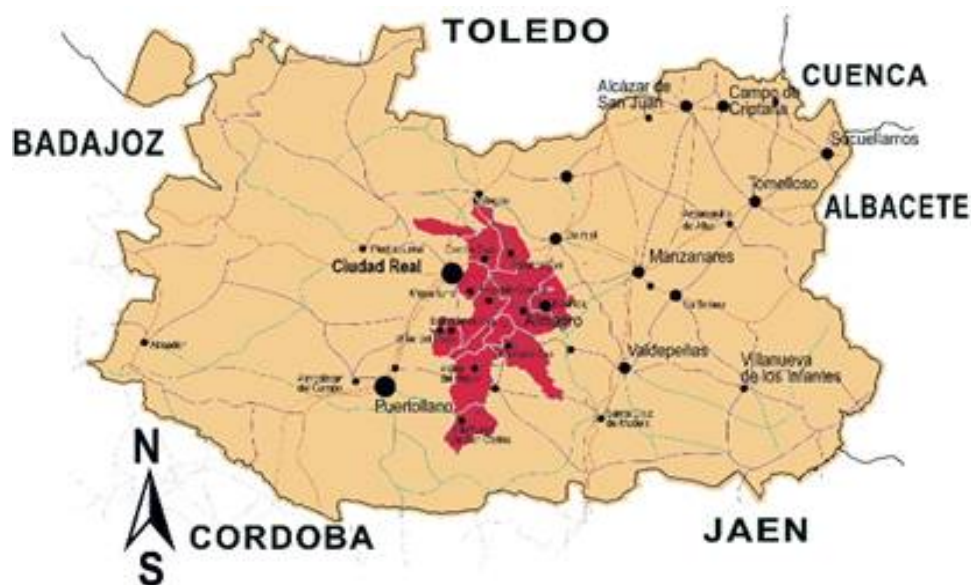


FIGURA 6. Mapa de la zona acogida a la IGP Berenjena de Almagro

Altimetría: La altitud media de la zona es de unos 680 metros sobre el nivel del mar, existiendo numerosas elevaciones no muy pronunciadas, que pueden sobrepasar los 900 metros.

Geomorfología y orografía: La zona presenta un relieve bastante homogéneo, donde las llanuras se ven constantemente interrumpidas por pequeños cerros y lomas que resisten a la erosión.

Suelo: Los suelos son calizo-arcillosos, con un horizonte aluvial y de desintegración “in situ”, de color rojizo claro y de bajo contenido en materia

orgánica, y otro horizonte inferior de acumulación de carbonatos cálcicos que en muchas ocasiones está cementado. Estos suelos, siempre que exista un buen aporte de materia orgánica vegetal y un riego adecuado, son idóneos para el cultivo de las berenjenas de Almagro.

Clima: El clima es mediterráneo continental de carácter extremado con grandes oscilaciones, inviernos muy fríos y veranos calurosos, alcanzándose en ocasiones los 40 °C, y con grandes diferencias de temperatura entre el día y la noche. Si el cultivo tiene suficiente humedad en el suelo, las temperaturas altas favorecen la vegetación, dando frutos uniformes y de buena calidad. La pluviometría media es de 430 mm³/año, concentrándose las lluvias en invierno (33%), primavera (30%) y otoño (27%). Los veranos son prolongados y secos.

Hidrografía: La zona es muy escasa en aguas superficiales por lo que prácticamente todo el cultivo de berenjenas se riega con agua del subsuelo.

3.1.2. El cultivo de las berenjenas de Almagro

La berenjena de Almagro es una variedad más próxima a la variedad silvestre, que otras berenjenas destinadas al consumo humano.

Los agricultores de la comarca son los que seleccionan y propagan las semillas ya que es un producto de agricultura familiar, con explotaciones que no superan las 1,55 Ha, por término medio.

La planta de la berenjena es muy esquilmante, por lo que se intenta no repetir el cultivo en la misma parcela hasta pasados al menos 6-7 años.

La siembra se hace en semillero, aproximadamente en el mes de febrero, y se trasplanta al terreno de asiento durante el mes de mayo, previo laboreo, estercolado y abonado mineral del mismo. El marco de plantación más común en esta zona es de 50 cm entre plantas y de 70-80 centímetros en línea, siendo la densidad de plantación de unas 25.000 plantas por hectárea.

El laboreo previo a la plantación suele consistir en dos labores, una profunda en invierno que se aprovecha para envolver el estiércol y otra más superficial 15 días antes de la plantación, en la que se añade un abono mineral. Durante el cultivo sólo se quitan las malas hierbas.

El cultivo de la berenjena es bastante exigente en lo que a temperatura e iluminación se refiere. Para una germinación óptima, requiere temperaturas en torno a los 22-25 °C, y para un correcto desarrollo, son necesarios entre 20 y 30 °C durante el día y entre 15 y 20 °C durante la noche, siendo bastante sensible a las heladas y considerablemente resistente a las altas temperaturas. De la misma manera, requiere una fuerte iluminación para su desarrollo y floración. En cuanto a la humedad relativa, su óptimo está entre un 60 y un 70%.

En cuanto a las exigencias hídricas del cultivo, hay que señalar que la berenjena es un cultivo con una elevada resistencia al estrés hídrico, por lo que tras una época de sequía, tiene facilidad para recuperarse. Sin embargo, para que el fruto tenga unas características adecuadas debe disponer, especialmente durante la fructificación, de agua en abundancia. Como en la zona de cultivo los aportes de lluvia no suelen ser suficientes, es habitual complementar con riegos que se distribuyen con la periodicidad necesaria.

Los suelos ideales para el cultivo de la berenjena son los de textura arcillo-arenosa, que aseguran la percolación del agua hacia capas más profundas y evitan el encharcamiento cerca de las raíces, si bien pueden cultivarse también en suelos arcillosos y compactos. El pH óptimo se encuentra entre 6 y 7.2, aunque puede resistir valores más alcalinos. Resiste la salinidad y requiere de la presencia de materia orgánica, puesto que se trata de un cultivo muy exigente en elementos nutritivos. No obstante, si se abona en exceso puede producirse un desarrollo vegetativo excesivo en detrimento de la floración y de la fructificación.

El fruto de la variedad usada en la elaboración de las "Berenjenas de Almagro" es una baya carnosa de color verdoso cuando está cubierta por el cáliz, tornándose de color morado u oscuro si se encuentra descubierta. Suele tener forma redondeada, piriforme o aovada, y una longitud de unos 7 a 10 cm. Estas características la convierten en un producto muy apropiado para la elaboración industrial.



FIGURA 7. Frutos utilizados en la elaboración de Berenjenas de Almagro

La pulpa presenta una coloración blanquecina y en su interior pueden distinguirse las semillas cuando el fruto está maduro y es característica la presencia de espinas en las brácteas y en el pedúnculo.

La recolección es manual y se realiza cada 3 ó 4 días, cuando los frutos alcanzan el momento de madurez óptima. La campaña suele iniciarse en el mes de julio y finaliza en el mes de noviembre con la bajada de las temperaturas, si bien este periodo puede variar con las condiciones climatológicas.

3.1.3. Elaboración de las Berenjenas de Almagro

La primera referencia escrita en la que se describen con cierto detalle las etapas del proceso de elaboración de las “Berenjenas de Almagro”, es el estudio publicado por Morales Mocino en 1985, que incluye un esquema del proceso de elaboración (Figura 8), aunque no hace alusión alguna al proceso microbiológico que tiene lugar durante la etapa de la fermentación.

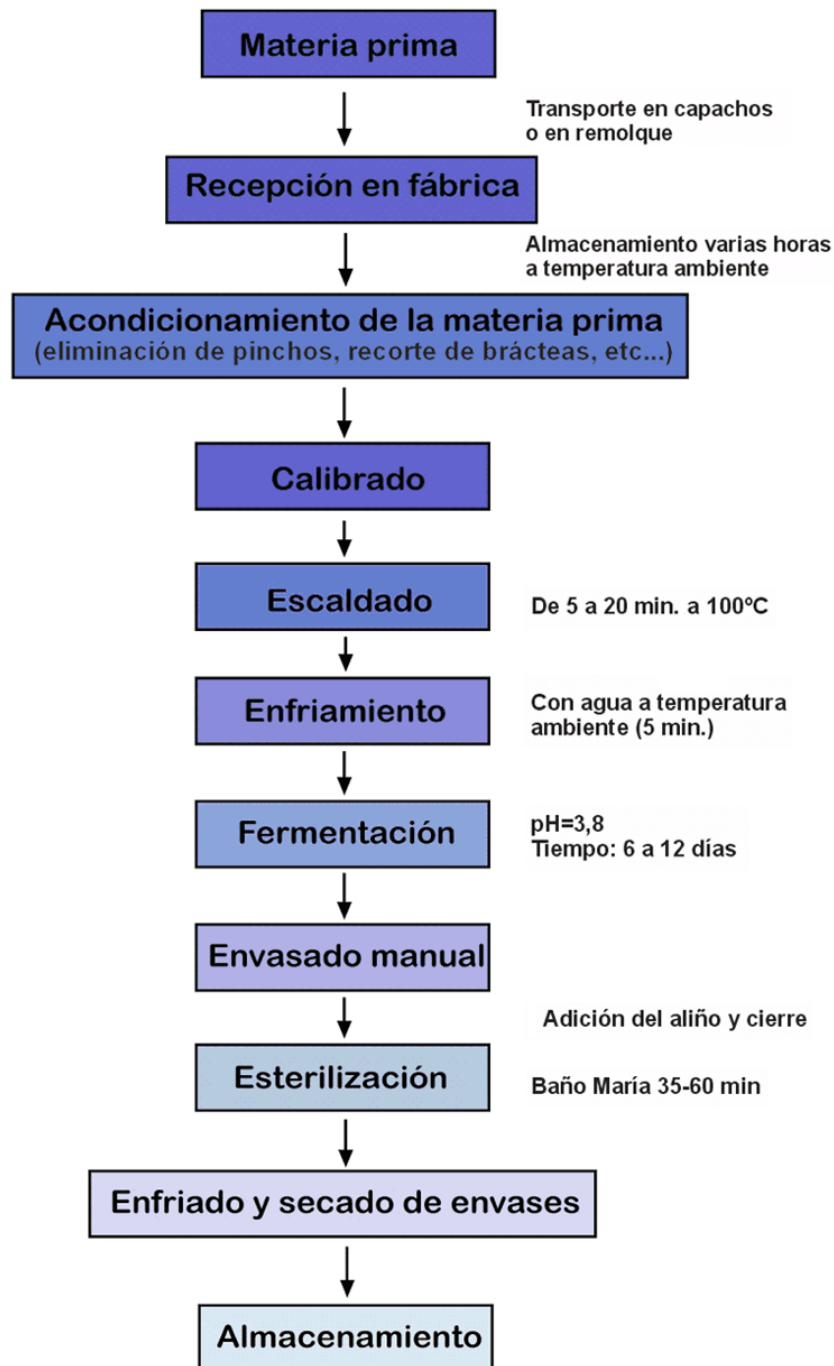


FIGURA 8. Esquema del proceso de elaboración tradicional de las "Berenjenas de Almagro"
(Fuente: Morales Mocino, 1985)

Años más tarde, cuando en Julio de 1994 se crea el Consejo Regulador "Berenjena de Almagro", con el objetivo de controlar y garantizar la calidad del producto acogido a la IGP "Berenjena de Almagro", se hace público en el D.O.C.M. un Reglamento donde se recogen tanto aspectos referidos a las características de la materia prima y del producto acabado, como aquellos del proceso de elaboración, que serán de obligado cumplimiento para el producto que quiera acogerse a esta IGP. Este reglamento indica además que los controles serán realizados por los veedores del Consejo, tanto en campo como en fábrica, comprobando entre otros aspectos la producción, la procedencia y la calidad tanto de la materia prima como del producto acabado.

Seguidamente, y a modo de resumen, se incluyen los artículos 8º y 9º del Capítulo Tercero de este Reglamento, que recogen algunos aspectos de la materia prima y del proceso de elaboración, interesantes en nuestro estudio.

Artículo 8º

1. *La zona de producción y elaboración estará compuesta por los términos municipales de Aldea del Rey, Almagro, Bolaños, Calzada de Calatrava, Granátula de Calatrava y Valenzuela de Calatrava.*

2. *Las berenjenas protegidas por la Denominación Específica "Berenjena de Almagro" destinadas a conserva deberán ser frutos frescos y tiernos de la especie *Solanum melongena* L. var. *esculentum depressum* o Almagro, que corresponde a la siguiente descripción morfológica.*

- *El fruto es una baya carnosa de forma variable (redonda, alargada, aplanada...) y de colores muy diversos (verde, morado, violeta...).*
- *El fruto maduro tiene forma piriforme de longitud variable y es pedunculado.*
- *La baya se encuentra en su mayor parte cubierta por el cáliz y es de una tonalidad verde pálido, tornándose de color violáceo la parte descubierta por la exposición al aire.*

Artículo 9º

1. Todas las berenjenas que vayan a ser amparadas por la Denominación Específica deberán ser seleccionadas cuidadosamente, antes de someterlas al proceso de elaboración, eliminando aquellas que estén dañadas, alteradas, etc.

2. La elaboración de la “Berenjena de Almagro” comprenderá los siguientes procesos:

- **ESCALDADO:** éste se efectuará de 5 a 20 minutos y, en todo caso, el tiempo suficiente para inhibir la actividad microbiana indeseable y que los frutos conserven la textura sin ablandarse.

- **FERMENTACIÓN:** una vez cocidas las berenjenas, se someten a un proceso de fermentación en recipientes adecuados, donde se le agregará el aliño correspondiente. El tiempo de fermentación estará comprendido entre cuatro y veinte días.

- **ALIÑO:** comprenderá los productos: vinagre, aceite vegetal, sal común, cominos, ajos, pimentón y agua. Se podrán utilizar los aditivos que autoricen las normas de calidad correspondientes.

- **ENVASADO:** se efectuará con los procedimientos mecánicos permitidos y en condiciones de higiene y conservación necesarios, en recipientes metálicos, de vidrio o de otros materiales amparados por la legislación vigente.

3. Atendiendo a su forma de elaboración y presentación, la Denominación Específica, ampara las siguientes denominaciones comerciales:

- Aliñadas, que serán frutos enteros con brácteas y pedúnculo sin más adición que su propio aliño.

- Embuchadas, son aliñadas con un corte en la parte superior que se rellena con un trozo de guindillón de pimienta natural, sujeto con un tallo de hinojo que atraviesa la berenjena.

- Embuchadas con pasta de pimienta, sustituyendo el pimienta natural por pasta de pimienta, elaborada con pimienta, alginato sódico, goma guar y cloruro cálcico.

- Troceadas, frutos desprovistos de brácteas y pedúnculo. El resto del fruto troceado.

4. El análisis del producto elaborado estará en torno a las siguientes cantidades:

PROTEÍNAS (%).....	1-2,5
GRASA VEGETAL (%).....	0,2-1,5
HIDRATOS DE CARBONO (%).....	3-4,5
CALCIO (ppm).....	400-1000
POTASIO (ppm).....	500-2500
FÓSFORO (%).....	0,01-0,04
FIBRA (%).....	0,5-3
pH.....	≤ 5

De la lectura de este documento y de la breve descripción que en el mismo se hace del proceso de elaboración, en especial de la etapa de fermentación y de los aspectos microbiológicos de la misma, se desprende un gran desconocimiento de lo que en ella ocurre.

La fabricación, aunque simple en esencia, es un proceso laborioso donde coexisten algunas prácticas tradicionales con nuevas tecnologías de producción. En este podemos distinguir 4 etapas fundamentales:

Pelado y selección: Estas operaciones se realizan manualmente. En el pelado se corta el pedúnculo y las brácteas para que no sobresalgan de los frutos y se eliminan el mayor número de espinas. Al mismo tiempo se lleva a cabo la selección, descartando los frutos que no reúnen las condiciones de tamaño, color o textura adecuadas. A continuación las berenjenas son calibradas y clasificadas por tamaños utilizándose para este fin clasificadoras mecánicas.

Escaldado: también denominado “cocido” de la berenjena. Las berenjenas son depositadas en grandes jaulas de acero inoxidable (Figura 9), que se sumergen en agua hirviendo el tiempo que el “experto” considera adecuado en función del calibre de los frutos.



FIGURA 9. Jaula utilizada en el escaldado

Fermentación: las berenjenas escaldadas son depositadas de forma cuidadosa en barriles, frecuentemente de plástico, a los que seguidamente se añade el aliño o “salmuera”. Las berenjenas son dejadas fermentar (Figura 10) de forma espontánea durante un tiempo que varía con el fabricante.

La salmuera que se añade a los fermentadores, se prepara siguiendo una receta “secreta” transmitida de generación en generación y, aunque su composición es muy diversa, siempre tiene como ingredientes fundamentales vinagre, sal y agua, a los que se añaden diferentes especias y condimentos.



FIGURA 10. Berenjenas en fermentación

Envasado: tras la fermentación las berenjenas son acondicionadas de distinta forma según el producto que vaya a ser preparado (aliñadas, embuchadas, rellenas, etc.) (Figura 11).



FIGURA 11. Distintos preparados de Berenjenas de Almagro

El envasado se realiza tanto en envases metálicos como de vidrio, con un líquido de gobierno compuesto básicamente por sal, vinagre y especias.

En la etiqueta de los productos acogidos a la IGP deben mencionar en su etiqueta (Figura 12) este hecho, indicando asimismo los estándares de calidad que cumplen.



FIGURA 12. Etiquetado de los productos acogidos a la IGP

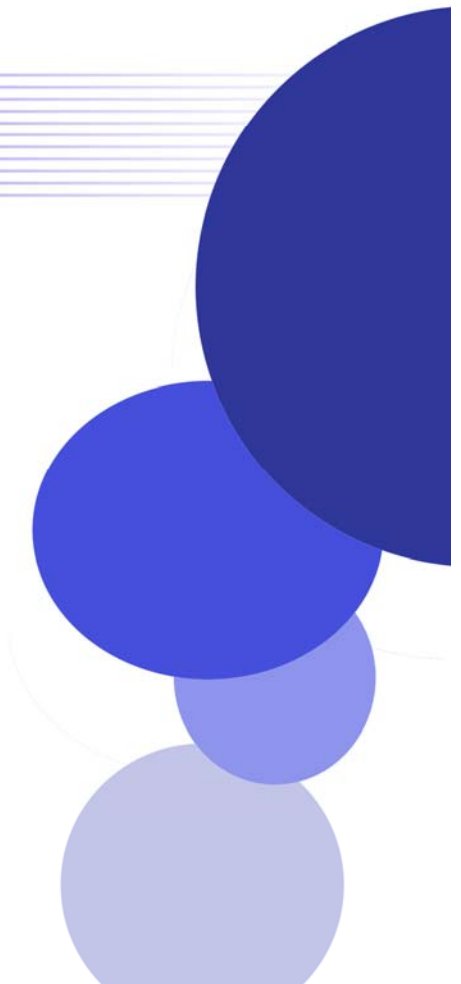
Las características organolépticas de la Berenjena de Almagro vienen determinadas por el tipo de elaboración. La textura depende fundamentalmente del momento de la recolección de los frutos y del ablandamiento producido durante las etapas de cocción y de fermentación. Su sabor es también muy variable dependiendo fundamentalmente de la composición del aliño. Es tradicional la colocación de una varilla de hinojo en el extremo lo que le proporciona un sabor muy peculiar.

El Consejo Regulador no dispone todavía de una ficha de cata oficial para evaluar la calidad sensorial del producto acogido a la IGP, aunque tenemos noticias de que está en fase de preparación.

Por último indicar que se han descrito numerosos beneficios para la salud derivados de su consumo, consecuencia de sus características nutricionales. Así por ejemplo, su elevado contenido en fibra hace mejorar el tránsito gastrointestinal. Entre sus características bromatológicas merece ser destacado su elevado contenido en vitamina A, ácido ascórbico, riboflavina, tiamina y minerales, calcio, fósforo, hierro, sodio y potasio, entre otros.



Objetivos



OBJETIVOS

La industria tradicional de elaboración de Berenjenas de Almagro, como toda industria artesanal, adolece de defectos y carencias, algunos de ellos ligados inevitablemente a la recolección de una sola cosecha anual de los frutos que son su materia prima. Es ésta una industria estacional, con campañas de 3 ó 4 meses de trabajo intenso, y un largo periodo de inactividad hasta la campaña siguiente lo que 1) plantea importantes inversiones económicas que se recuperan lentamente, 2) impide una programación económica y financiera competitiva y 3) obliga a tener una gran cantidad de producto inmovilizado, en espera de demandas imprevistas.

Como hemos descrito en la introducción de esta memoria, el procedimiento de elaboración utilizado por la industria es un tanto empírico y consiste en una fermentación espontánea en la que participa la microbiota epifítica presente en los frutos, en su mayor parte constituida por bacterias lácticas, y aquella otra adaptada a las instalaciones. Este tipo de procesos están por tanto expuestos a numerosos problemas, que limitan su rendimiento y pueden afectar a la calidad final del producto. En muchos casos, es difícil predecir el curso de la fermentación ya que ésta depende de muchos factores, algunos de los cuales son difícilmente controlables. Así por ejemplo, la carga microbiana de los frutos frescos, puede variar sustancialmente y esto incuestionablemente, influirá de una manera decisiva en el curso de la fermentación, tanto que en condiciones desfavorables puede detenerse e incluso, en el peor de los casos, puede no iniciarse.

En consecuencia, y para la obtención de un producto de calidad, sería necesario realizar un control del proceso, en especial de la etapa que pudiéramos considerar más determinante del mismo, la de la fermentación, como ocurre en la elaboración de otros alimentos fermentados.

La utilización de cultivos iniciadores es, en muchos casos, una buena alternativa a la fermentación espontánea, no sólo porque disminuye la probabilidad de que se produzcan fermentaciones anómalas sino también, porque los productos así obtenidos son de características organolépticas uniformes.

Son muchos los autores que afirman (Daeschel y Fleming, 1984; Rodrigo et al., 1985; Montaña et al., 1992, Vogel et al., 2002) que la búsqueda de un cultivo

iniciador es un proceso complejo que requiere, no sólo un estudio ecológico de los ecosistemas naturales de fermentación para conocer la microbiota presente en los mismos, sino también el estudio de las propiedades tecnológicas y fisiológicas de las cepas predominantes, para seleccionar aquellas que posean las mejores características para ser utilizadas a nivel industrial (Quiberoni et al., 1998). Sin duda, la microbiota existente en los procesos artesanales será la mejor adaptada a las condiciones de estos, y con su utilización podrá asegurarse el mantenimiento de las características de tipicidad propias de los productos que se elaboran.

Es necesario indicar que actualmente existe una gran preocupación por la continua pérdida de biodiversidad microbiana que se está produciendo como consecuencia del cambio hacia una producción industrial a gran escala, de alimentos típicos de la dieta mediterránea que, tradicionalmente se elaboraban siguiendo prácticas ancestrales. Una de las propuestas que contribuirá, aunque de forma indirecta, a la preservación de la diversidad genética y de genotipos microbianos desconocidos, es el aislamiento de los microorganismos presentes en estas fermentaciones responsables por tanto de las características finales de estos productos, y su conservación *ex situ*.

En el caso que nos ocupa, el de la elaboración de las **Berenjenas de Almagro**, fue hace unos años cuando en nuestro laboratorio, y a solicitud de una industria elaboradora, se inició un estudio para conocer la viabilidad de utilizar la congelación como método de conservación de las berenjenas, con el fin de alargar el periodo de producción y evitar, en la medida de lo posible, los problemas derivados de la estacionalidad, anteriormente mencionados. Con este se inició un amplio proyecto cuyos objetivos fueron 1) la caracterización del producto y 2) el conocimiento de los aspectos microbiológicos del proceso de elaboración, para la mejora de un producto como este de gran interés regional.

En el estudio de caracterización de las Berenjenas de Almagro comerciales realizado por Ballesteros (1996), se estudiaron sus propiedades físicas y mecánicas (textura), su composición química, color y defectos, y se pusieron de manifiesto importantes diferencias entre las mismas, algunas de ellas producidas sin duda, como consecuencia de procesos de fermentación ocurridos de muy distinta forma.

Los buenos resultados obtenidos en los estudios de congelación de las berenjenas (Universidad de Castilla-La Mancha, 1997), abrieron nuevas perspectivas a la industria de este sector y nos plantearon importantes retos en nuestra investigación, como el conocer que sucedería cuando se fermentaran frutos congelados en épocas del año distintas de las habituales, cuando las condiciones ambientales no fueran las más adecuadas. En este punto nos planteamos la necesidad y conveniencia de utilizar cultivos iniciadores como alternativa a la fermentación espontánea tradicional, lo que también evitaría los problemas de variabilidad encontrados en el producto comercial.

La selección de cepas con potencial para ser utilizadas como cultivo iniciador se inició con el estudio de la microbiota participante en la fermentación espontánea de las Berenjenas de Almagro, objeto de la Tesis Doctoral de la Dra. Sánchez (2002) y se ha continuado con los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral, cuyos resultados se presentan en esta Memoria.

Coincidiendo con las investigaciones de la Dra. Sánchez, y antes de la caracterización fisiológica y tecnológica de las cepas, se realizaron dos estudios preliminares, Capítulos 1 y 2 de esta memoria, cuyos objetivos fueron el estudio del efecto de la congelación de los frutos y de la influencia de la utilización de cultivos iniciadores en la fermentación y en las características sensoriales de las Berenjenas de Almagro.

Con los resultados obtenidos en éstos se consideró conveniente proceder a la caracterización de las cepas obtenidas por la Dra. Sánchez, para seleccionar aquellas más adecuadas, y una vez seleccionadas, se realizaron estudios de implantación tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. Estas investigaciones se recogen en los Capítulos 3 y 4 de esta Memoria.

Por último se ha realizado un estudio para conocer la biodiversidad de la microbiota láctica presente tanto en distintas empresas elaboradoras como en diferentes campañas de elaboración en una misma empresa. El objetivo de este era conocer el porqué de las diferencias en las características organolépticas encontradas en las Berenjenas de Almagro comerciales. Los resultados de este estudio se recogen en el quinto y último Capítulo de esta Memoria.

Objetivos

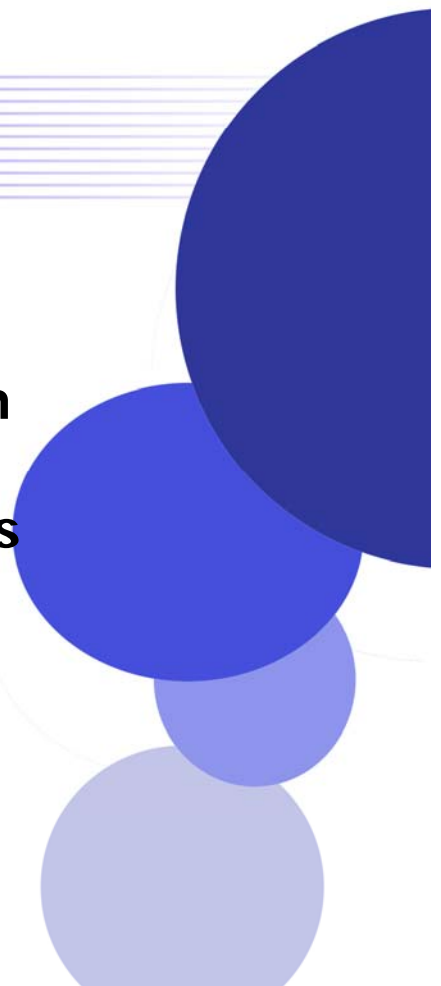
Los **objetivos** de esta Tesis Doctoral son:

- 1) La caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de la fermentación espontánea de Berenjenas de Almagro.
- 2) La selección de un cultivo iniciador para dirigir esta fermentación.
- 3) El estudio de la diversidad genética de la microbiota láctica en distintas empresas elaboradoras y en distintas campañas.

Capítulo 1

A series of horizontal lines of varying lengths and shades of purple, creating a sense of motion or a stylized underline.

**Efecto de la congelación de
los frutos en la fermentación
y en las características
sensoriales de las Berenjenas
de Almagro**



1.1. INTRODUCCIÓN

Las primeras referencias de la utilización del frío para la conservación de alimentos datan del año 1000 a.C. en China. Más tarde, fueron los griegos y los romanos los que empezaron a almacenar los alimentos en sótanos en los que previamente habían comprimido abundante nieve (Archer, 2004), y es en Francia en el siglo XVI cuando comienza a fabricarse hielo con fines alimentarios (Lund, 2000). En las primeras décadas del siglo XX, se desarrollan las tecnologías necesarias y ocurre la que se denomina “revolución” de los alimentos congelados.

La conservación de los alimentos mediante congelación constituye un método eficaz para mantener durante largo tiempo, y casi inalteradas, las características originales de muchos alimentos que, o son perecederos o estacionales, en cuyo caso el tratamiento de congelación permite consumirlos en cualquier época del año (Canet, 1985; Lafuente, 1985). Esto se consigue gracias a que la congelación inhibe o ralentiza las reacciones enzimáticas y la actividad de los microorganismos. Adecuadamente aplicada, la congelación permite mantener los atributos de calidad y el valor nutritivo de los alimentos, produciéndose únicamente en algunos casos cambios en la textura. Por todo ello, es actualmente el método de conservación de alimentos más utilizado, pudiendo aplicarse a un gran número de ellos.

En el caso de los productos hortofrutícolas, la congelación puede aplicarse tanto a elaborados, como a semielaborados, como a materias primas frescas o previamente acondicionadas, que serán posteriormente transformadas.

La congelación de vegetales, cuando se realiza en óptimas condiciones, permite conservar su calidad durante periodos que oscilan entre los 12 y los 36 meses, si bien hay un gran número de factores que pueden influir como son el tipo de producto, su madurez y calidad inicial, la forma en que se realice la recolección, el tiempo transcurrido entre ésta y el procesado, así como los tratamientos térmicos a los que es sometido con anterioridad a la operación de congelación (Sánchez et al., 1994). Todos estos factores y su interacción, unido a las posibles deficiencias en el mantenimiento de la cadena de frío tras la congelación, hacen patente la dificultad de optimizar el proceso en su totalidad, para dar una respuesta satisfactoria a las expectativas de calidad deseadas por el consumidor.

La congelación propiamente dicha consiste en la disminución de la temperatura del producto hasta alcanzar, por lo general, temperaturas de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en su centro térmico, lo que produce la cristalización de la mayor parte del agua y de algunos solutos presentes en el mismo. Es fundamental la velocidad a la que se lleva a cabo el proceso, ya que cuando la congelación es demasiado lenta, los cristales de hielo formados por la migración de las moléculas de agua desde su localización normal hacia los lugares de cristalización, son de gran tamaño y las paredes celulares se encuentran sometidas a grandes tensiones internas, que pueden causar su ruptura. En la descongelación estos productos perderán gran parte de los líquidos intracelulares, lo que puede ir acompañado de una pérdida de su valor nutricional (Brown, 1979; Fuster et al., 1980). Si la velocidad de congelación es rápida, los cristales que se forman son por el contrario pequeños y no existen riesgos de que se produzcan rupturas de las paredes.

Por otro lado, es interesante tener en consideración el efecto que la aplicación de estas temperaturas y la velocidad del proceso, puede tener en la microbiota presente en los frutos, especialmente en aquellos casos como el que nos ocupa, en el que la materia prima congelada será posteriormente fermentada de forma espontánea. Diversos autores (Valles y Mocquot, 1968; Stadhouders et al., 1971) han indicado que temperaturas de conservación comprendidas entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ no producen pérdidas considerables en la viabilidad celular.

Como hemos indicado en la introducción de esta memoria, la elaboración de Berenjenas de Almagro tiene un marcado carácter estacional, lo que ocasiona importantes problemas para el sector industrial dedicado a su producción. Esta problemática hizo que en el área de Tecnología de Alimentos se realizara un estudio para conocer la viabilidad de la congelación de las berenjenas, cuyos buenos resultados permitieron el desarrollo de una patente (Universidad de Castilla-La Mancha, 1997). Finalizado este estudio nos planteamos la necesidad de conocer la influencia que la utilización de frutos congelados tendría en la fermentación y en la composición de la microbiota láctica participante, así como en las características sensoriales del producto fermentado, siendo estos los objetivos de este trabajo.

1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

1.2.1. Material

Se utilizaron berenjenas (*Solanum melongena* L. var. *esculentum depressum*) de un tamaño medio (entre 34 y 44 g) recién recolectados, que fueron acondicionados y tratados en las condiciones habitualmente utilizadas por la empresa, es decir se cortaron los pinchos y las brácteas para que no sobresalieran del fruto y en algunos casos el pedúnculo para dejarlo en torno a unos 5 cm de largo. A continuación se lavaron con agua clorada para eliminar restos de tierra y contaminantes.

1.2.2. Diseño experimental

Este estudio se realizó en las instalaciones de una de las principales empresas elaboradoras de Berenjenas de Almagro.

Se realizaron 2 fermentaciones a escala piloto, una con frutos frescos y otra con frutos congelados.

Los procesos de escaldado y posterior enfriamiento también se realizaron como es habitual en la industria. Tras el enfriado las que iban a ser congeladas se dispusieron en bandejas de fondo perforado, en una sola capa y separadas entre si y se introdujeron a -18 °C en un armario congelador con convección forzada de aire (Conatec HT 8600A), como describen otros autores (Canet y Espinosa, 1983; Hung y Thompson, 1989; Martín y Masoud 1997a, b). Los frutos se mantuvieron en estas condiciones durante tres meses.

Se fermentaron 4 lotes de 5 Kg de berenjenas cada uno. Se utilizaron barriles de plástico similares a los empleados en la fábrica pero de menor capacidad (15 L). Una vez colocadas las berenjenas, los barriles se llenaban con salmuera y se tapaban con tapas de plástico agujereadas para evitar que las berenjenas flotasen. Dos de los lotes contenían berenjenas escaldadas y congeladas (BEC-1 y BEC-2), que se descongelaron al introducirlas en la salmuera de fermentación y otros dos contenían berenjenas sólo escaldadas (BE-1 y BE-2). Estos últimos se utilizaron como control.

La salmuera utilizada fue la de la industria y contenía como ingredientes principales ácido cítrico, sal molida, vinagre, Tween 80 y colorante, en proporciones adecuadas. Las berenjenas una vez cubiertas con la salmuera, fueron dejadas fermentar de forma espontánea a temperatura ambiente durante 10 días.

Para el seguimiento de la fermentación se tomaron muestras de salmuera diariamente que fueron analizadas química y microbiológicamente. La toma de muestras se realizó en las mejores condiciones de asepsia, en tubos de plástico de 10 mL de capacidad, evitando tomar de la capa superior, cubierta por un espeso velo. Los tubos se llenaban en su totalidad para evitar espacios de cabeza donde se dieran condiciones de aerobiosis y eran mantenidos en refrigeración hasta su análisis.

Cuando finalizaron las fermentaciones, se añadió metabisulfito sódico en una concentración del 0,03% (p/v), como se hace tradicionalmente en la industria, y transcurridas 24 h las Berenjenas se envasaron en botes de medio kilo inmersas en el líquido de gobierno utilizado en la industria. Los botes fueron cerrados y pasterizados en las instalaciones de la empresa colaboradora.

1.2.3. Métodos

1.2.3.1. Análisis químico

Las muestras de salmuera fueron centrifugadas ($7000 \times g$ /15 min. a 5 °C) y el sobrenadante libre de células fue decolorado con carbón activo (Panreac) y filtrado en papel Albet 400, hasta conseguir que desapareciera el intenso color amarillo del colorante, para evitar de este modo interferencias en las determinaciones colorimétricas.

A continuación se realizaron las siguientes determinaciones:

a) Glucosa y fructosa

Se utilizó el test enzimático D-glucosa/D-fructosa (Boehringer Mannheim, GmbH., Mannheim, Germany), basado en el procedimiento descrito por Beutler (1984) y Kunst et al. (1984).

b) Ácidos D y L-láctico

Se determinaron enzimáticamente usando un kit que contiene D-lactato y L-lactato deshidrogenasa (Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany), según el método descrito por Gawehn y Bergmeyer (1974) y Gutmann y Wahlefeld (1974).

c) pH

Se midió con un pHmetro CRISON 2002.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

1.2.3.2. Análisis microbiológico

a) Recuentos y obtención de aislados de bacterias lácticas

Las muestras de salmuera fueron diluidas en solución salina (NaCl 0,9%, p/v) y posteriormente sembradas en agar MRS (Man et al., 1960). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48-72 h en jarras de anaerobios utilizando generadores de anaerobiosis (Anaerobic System "Anaerogen", Oxoid).

Aquellas placas con un número de colonias comprendido entre 30 y 300 fueron utilizadas para los recuentos, que se expresaron como unidades formadoras de colonias por mL (ufc/mL).

De las placas utilizadas en los recuentos, se tomaron al azar un número de aislados igual a la raíz cuadrada del número de colonias contadas (Harrigan y McCance, 1976), que fueron cultivados en caldo MRS a 37 °C durante 24 h en aerobiosis.

b) Purificación y mantenimiento de los aislados

Los aislados fueron purificados mediante sucesivas resiembras por agotamiento en placas de agar MRS, hasta que las colonias crecidas mostraban idéntica morfología. Las condiciones de incubación utilizadas fueron las descritas en el apartado anterior.

La confirmación de la pureza de los cultivos se realizó mediante observación microscópica de las células teñidas mediante tinción Gram (Bartholomew, 1962).

Los aislados puros crecidos en caldo MRS se conservaron, con un 20% (v/v) de glicerol estéril, a -80°C en criotubos.

c) Identificación fenotípica de los aislados

Los aislados puros mantenidos en congelación, fueron cultivados dos veces en caldo MRS a 37°C durante 24 h antes de proceder a su identificación.

En este estudio se utilizaron como referencia las siguientes cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) siguientes: *L. plantarum* 220, *L. brevis* 216, *L. fermentum* 285, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 219 y *P. pentosaceus* 923.

La identificación fenotípica de los aislados, consistió en:

c.1) Pruebas bioquímicas

- Prueba de la catalasa

Se realizó según el procedimiento descrito por Norris et al. (1981).

- Producción de CO_2 por fermentación de la glucosa

Se determinó en tubos que contenían 10 mL de caldo MRS y una campana de fermentación, siguiendo el procedimiento descrito por Müller (1990). Los tubos fueron incubados a 37°C durante 48 h en aerobiosis. La prueba era considerada positiva, si tras la incubación se observaba acumulación de gases en la parte superior de la campana.

- Formación de NH_3 por hidrólisis de la arginina

Como medio de cultivo se utilizó caldo MRS modificado, sin extracto de carne, con un 0,3% (p/v) de arginina (Sigma) y un 0,2% (p/v) de citrato sódico que reemplazaba al citrato diamónico (Shaw y Harding, 1984; Schillinger y Lücke, 1987). La concentración de glucosa en el medio era del 0,05% (p/v), muy inferior al 2% habitual (Hitchener et al., 1982).

La lectura de los resultados se realizó tras cinco días de incubación a 37 °C en aerobiosis, añadiendo a los cultivos unas gotas del reactivo de Nessler (Merck). La aparición inmediata de un color rojo o anaranjado era considerada como un resultado positivo.

- Perfil de fermentación de carbohidratos

El objetivo de este ensayo fue el agrupamiento de los aislados antes de su identificación definitiva con tiras API 50CH.

Para ello, se siguió el procedimiento descrito por Jayne-Williams (1976) utilizando placas de microtitulación. Al medio de cultivo, MRS base sin azúcar (Scharlau) que se preparaba 2 veces concentrado, se añadían soluciones acuosas de los distintos azúcares. Los azúcares ensayados fueron los descritos por Kandler y Weiss (1986): celobiosa, lactosa, xilosa, ribosa, maltosa, trehalosa, melezitosa, amigdalina, salicina, fructosa, manitol, melibiosa, galactosa, sacarosa, glucosa, sorbitol, rafinosa, manosa, ramnosa, esculina y arabinosa. Las soluciones de estos azúcares se prepararon de forma que la concentración final en el ensayo fuera del 2%, excepto en el caso de la esculina que, por su escasa solubilidad, fue del 1%. Estas soluciones se esterilizaron por filtración utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa (Millex-GV Millipore CORP) de 0,22 µm.

Las células utilizadas como inóculo se prepararon según el esquema de la Figura 1.1. El volumen final en cada pocillo era de 200 µL, 100 µL de la solución del azúcar y 100 µL de inóculo (MRS base + células). Antes de la incubación se añadieron a cada pocillo dos gotas de vaselina líquida estéril para crear condiciones de anaerobiosis. Todos los ensayos incluían dos controles, uno donde no se añadía el inóculo para detectar una posible contaminación del medio de cultivo, y otro donde la solución del azúcar había sido sustituida por agua, para conocer si el tiempo de incubación en el cultivo de agotamiento había sido suficiente.

El resultado era positivo, es decir la cepa fermentaba el azúcar, cuando se producía un viraje del color rojo del indicador rojo de clorofenol que contiene el

medio, a amarillo como consecuencia del descenso de pH. Se consideraba débilmente fermentativo cuando el color final era anaranjado.

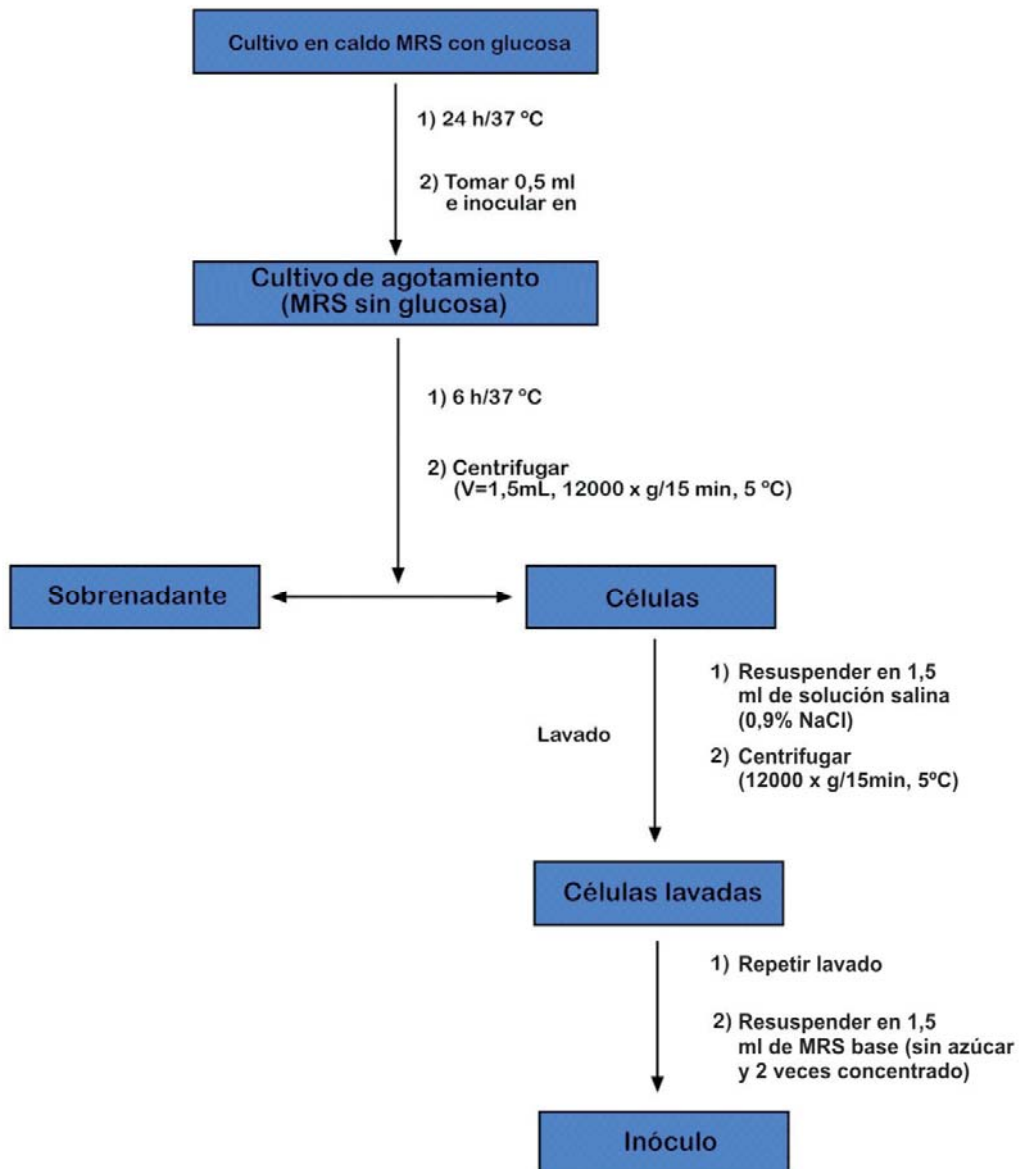


FIGURA 1.1. Esquema de preparación del inóculo para las placas de microtitulación

- Tiras API 50 CH (bioMérieux, Francia)

Este sistema de identificación fue utilizado con un 20% de los aislados, lo que nos permitió confirmar los resultados obtenidos en las placas de microtitulación y completar el perfil de fermentación de azúcares.

Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante. Las galerías se incubaron a 37 °C, efectuándose lecturas a las 24 h y a las 48 h de incubación.

Los perfiles bioquímicos obtenidos fueron interpretados de forma automatizada utilizando el sistema informático de identificación microbiana APILAB Plus, versión 3.3.3. (BioMérieux, Francia). Este sistema asigna a cada perfil bioquímico el taxón más probable aportando la siguiente información:

El porcentaje de identificación (% Id.): que estima la semejanza entre el perfil que se ha introducido en el sistema y el perfil correspondiente al taxón que da como respuesta el programa.

El índice T: que es una estimación de la proximidad del perfil al conjunto de reacciones más típico para el taxón correspondiente. Su valor varía entre 0 y 1 y es inversamente proporcional al número de tests atípicos.

La calidad de la identificación, que tiene en cuenta los valores del % Id. y del índice T, los tests en contra de la identificación y el porcentaje de reacciones positivas.

Además, proporciona información acerca de las pruebas bioquímicas complementarias que deben realizarse en el caso de que la identificación sea dudosa y/o exista baja discriminación entre dos o más taxones. Estos tests van acompañados de los correspondientes porcentajes de reacciones positivas.

- Configuración del ácido láctico formado a partir de la glucosa

Se utilizó el kit enzimático citado en el punto bdel apartado 1.2.2.1.

c.2) Ensayos de crecimiento

Se ensayaron diferentes temperaturas de crecimiento (5, 15 y 45 °C) y distintas concentraciones de NaCl (40, 65 y 80 g/L) (Kandler y Weiss, 1986).

La preparación de las placas y los criterios utilizados en la interpretación de los resultados fueron idénticos a los descritos en los ensayos de fermentación de azúcares, excepto en que en los ensayos de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl, se sustituyó el indicador rojo de clorofenol por el púrpura de bromocresol. Con este, el viraje del color púrpura al amarillo se produce a un pH de 5,2, algo superior al necesario para el viraje del rojo de clorofenol (4,8), lo que resultaba especialmente útil en estos ensayos, ya que los descensos de pH no eran tan acusados. En todos los casos, las placas se incubaron en condiciones aerobias efectuándose las lecturas de los resultados a los 2 y a los 5 días de incubación. La temperatura de incubación en los ensayos de crecimiento con distintas concentraciones de NaCl fue de 37 °C.

1.2.3.3. Análisis sensorial

Dos meses después del envasado, se realizó el análisis sensorial de las berenjenas congeladas fermentadas en este estudio (BEC) y de otras 2 muestras de marcas comerciales que fueron adquiridas en una gran superficie. Una de las marcas era la que comercializa la empresa donde se realizaron las fermentaciones.

Las muestras (Berenjenas enteras) fueron identificadas empleando un código de 3 dígitos, una letra central flanqueada por 2 números, y se presentaron a los catadores de forma aleatoria en platos de plástico. La temperatura de las muestras fue de 20 °C, siguiendo las recomendaciones de Paulus y Reisch (1980). Las muestras fueron catadas por duplicado en sesiones diferentes, en una sala de cata con cabinas individuales normalizadas (ISO, 1988b). Sólo se realizaron sesiones matinales en horario de 12:00 a 14:00 horas.

Los catadores fueron advertidos de que un consumo excesivo de muestra durante la degustación podría producir saturación por la liberación de

compuestos volátiles aromáticos, y esto podía traducirse en puntuaciones superiores a las reales en algunos atributos.

Se realizaron dos tipos de análisis:

A) Análisis sensorial descriptivo

Se contó con la participación de un grupo de 12-14 personas (personal docente e investigador del Área de Tecnología de Alimentos) de edades comprendidas entre los 21 y los 41 años, algunos de los cuales tenían experiencia previa en análisis sensorial. Se seleccionaron según su interés, su disponibilidad de tiempo, su capacidad discriminatoria y su agudeza olfato-gustativa. Su participación en las sesiones no fue remunerada.

Antes de iniciar el entrenamiento se facilitaron unas nociones básicas sobre las técnicas de evaluación sensorial. En las sesiones de entrenamiento se utilizaron muestras comerciales. En éstas se presentaban 3 Berenjenas y se solicitaba a los catadores que describieran, con los términos que consideraran más oportunos, las características olfato-gustativas de las mismas. Con estos informes se elaboró un listado de atributos que más tarde fueron discutidos para eliminar por consenso aquellos que fueran sinónimos, confusos o poco representativos y seleccionar aquellos más adecuados.

Con estos atributos se preparó una ficha de cata en la que los catadores tenían que indicar la intensidad de cada atributo en una escala no estructurada de 10 cm. En los extremos de la escala se colocaron los términos “baja o alta intensidad” del atributo, excepto en la escala de color donde se emplearon los términos “verde claro” a la izquierda y “verde oscuro” a la derecha, en la de dureza donde se puso “blanda” a la izquierda y “dura” a la derecha y en las de calidad olfativa, calidad del deajo e impresión global donde se colocó a la izquierda el término “pobre” y a la derecha “excelente”.

En cada sesión se evaluaron 3 muestras diferentes elegidas al azar que se colocaban en los platos en todos los órdenes posibles para minimizar cualquier influencia del orden de presentación.

B) Prueba de preferencia

En este participaron un grupo de 22 consumidores/estudiantes (60% mujeres y 40% hombres). Se evaluaron las 3 muestras elegidas al azar que se presentaban en todos los órdenes posibles.

Se empleó un test hedónico (ISO, 1988a), en el que se proporcionaba a los catadores una ficha como la de la Figura 1.2 y se les pedía que tras la evaluación global (aspecto, aroma, sabor, textura...) de las Berenjenas, las ordenaran según su preferencia.

FORMULARIO PRUEBA DE ORDENACIÓN		
NOMBRE:		
FECHA:		
Por favor, ordene las muestras de acuerdo con su preferencia (indicando cada muestra por su clave correspondiente).		
Nota: Entre cada una de las muestras proceda a comer colines y beber agua para eliminar en lo posible el sabor de la anterior.		
MUESTRA MÁS PREFERIDA	PREFERENCIA INTERMEDIA	MUESTRA MENOS PREFERIDA
¿Por qué la muestra _____ es la más preferida?		
¿Por qué la muestra _____ es la menos preferida?		
MUCHAS GRACIAS		

FIGURA 1.2. Ficha de cata empleada en el test hedónico

El lugar otorgado por cada consumidor a cada una de las muestras fue convertido a un valor numérico para lo cual se asignaba un 1 a la muestra más preferida, un 2 a la intermedia y un 3 a la menos preferida. A continuación se calculaba para cada muestra un valor que era el sumatorio de las puntuaciones obtenidas en las diferentes sesiones.

1.2.3.4. Análisis estadístico de los resultados

Para determinar la significación de los valores medios obtenidos para cada uno de los atributos evaluados se aplicó la comparación múltiple de medias o test de Student-Newman-Keuls, a los resultados del análisis descriptivo, usando un nivel de significación de $\alpha \leq 0,05$.

El test de Friedman (O'Mahony, 1986) usando un nivel de significación de $\alpha \leq 0,05$ fue aplicado a los resultados del test hedónico para determinar si la preferencia era o no significativa. Se calcularon los valores de la mínima diferencia significativa (LSD "least significant difference") para averiguar qué muestras eran significativamente preferidas a las otras.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico SPSS para Windows (versión 10.0) (SPSS, 2000).

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Evolución de la fermentación

La Figura 1.3 muestra la evolución de los parámetros físico-químicos y los recuentos obtenidos durante la fermentación de las berenjenas congeladas (BEC) y no congeladas (BE). Los valores representados son las media de los obtenidos en las muestras tomadas en cada fermentador.

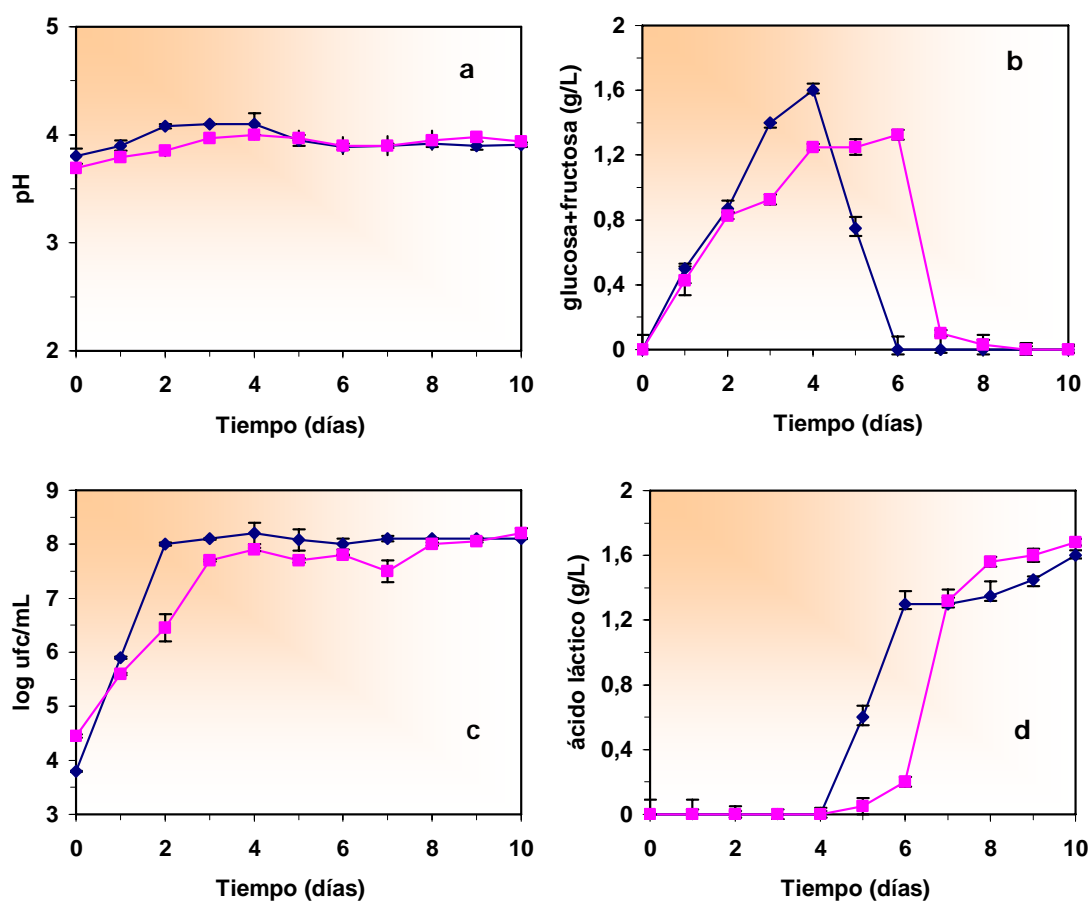


FIGURA 1.3. Evolución de la fermentación. ■ Berenjenas escaldadas y congeladas (BEC) y ◆ Berenjenas escaldadas (BE) a: pH, b: Concentración de Glucosa + Fructosa c: Recuento de bacterias lácticas d: Concentración de ácido láctico

La evolución del pH (Figura 1.3 a) fue muy similar en ambas fermentaciones. Durante los primeros días se produjo un ligero incremento consecuencia del intercambio que se establece entre el fruto y la salmuera hasta alcanzarse un equilibrio. Más tarde, coincidiendo con la aparición de ácido láctico (Figura 1.3 d) se observó un ligerísimo descenso del pH. La capacidad tamponante de la salmuera parece evitar cambios bruscos del pH. El valor alcanzado al final de la fermentación, en torno a 3,9, es idóneo para evitar el desarrollo de microorganismos indeseables (Ballesteros et al., 1999).

La Figura 1.3 b y d muestran la evolución de los azúcares (Glucosa+Fructosa) y del ácido láctico en la salmuera. En las primeras horas del proceso y antes de que se inicie la fermentación vigorosa, ocurre un proceso de difusión de los azúcares desde los frutos, que hace aumentar su concentración en la salmuera. A partir del día 4, coincidiendo con los valores máximos en los recuentos de BL (Figura 1.3 c) se produce un rápido consumo de los azúcares y la aparición simultánea de ácido láctico. La diferencia más destacable entre ambos procesos fue que mientras en los fermentadores que contenían berenjenas no congeladas (BE) la fermentación vigorosa se iniciaba el día 4, en los que contenían berenjenas congeladas (BEC) lo hacía el día 6, retrasándose también la finalización del proceso, determinada por el agotamiento de los azúcares de la salmuera.

La concentración de azúcares alcanzada en la salmuera de ambas fermentaciones fue muy similar. Ballesteros (1996), recomienda que la congelación de las berenjenas se realice tras el escaldado, como se ha hecho en este estudio, para evitar la excesiva pérdida de azúcares que se produce cuando ésta se realiza con anterioridad.

Los recuentos de bacterias lácticas (Figura 1.3 c), aunque algo menores y más retrasados en los fermentadores con berenjenas congeladas, siguieron una evolución paralela, alcanzándose en ambos casos valores al final de la fermentación de 10^8 ufc/mL. El efecto adverso que la congelación puede causar en las células podría explicar estas pequeñas diferencias.

Numerosos investigadores (Tsvetkov y Shishkova, 1982; Gilliland, 1985; Champagne et al., 1991; Picque et al., 1992; Fonseca et al., 2000) han descrito

que la formación de cristales de hielo en el interior celular durante la congelación a estas temperaturas, causa importantes daños en la membrana, afectando a la viabilidad de las células, e indican que el daño producido varía incluso con las cepas, dependiendo del área superficial celular expuesta.

1.3.2. Identificación de los aislados

De las placas de agar MRS utilizadas en los recuentos se obtuvieron 164 aislados, que fueron purificados y sometidos a las pruebas de identificación. 18 resultaron ser Gram negativo y/o catalasa positivo por lo que fueron eliminados. El 48,6% de los aislados restantes (71) procedían de las muestras tomadas en los fermentadores con BEC y el resto de los fermentadores con BE.

La morfología celular de estos aislados observada en la tinción Gram fue variada. La mayoría aparecían como bacilos rectos, en parejas y/o en cadenas cortas, algunos eran coco-bacilos y otros eran mezclas de bacilos cortos y largos de pequeño grosor.

El aspecto de las colonias crecidas en agar MRS fue también muy diverso, observándose algunas de color blanco intenso, convexas y sin brillo, y otras de color crema, planas y muy brillantes. Unos pocos aislados produjeron colonias con un aspecto muy peculiar, blancas, granulosas, algo irregulares y con un punto elevado en el centro (Figura 1.4)



FIGURA 1.4. Morfología colonial observada en las placas de MRS

Los resultados obtenidos en los ensayos de producción de CO₂ de la glucosa y de la producción de NH₃ de la arginina, además de la morfología celular, permitieron establecer 3 grupos:

- Grupo I: Bacilos CO₂ (-) (homofermentadores o heterofermentadores facultativos) y NH₃ de la arginina (-)
- Grupo II: Bacilos CO₂ (+) (heterofermentadores obligados) y NH₃ de la arginina (-)
- Grupo III: Bacilos CO₂ (+) (heterofermentadores obligados) y NH₃ de la arginina (+)

Axelsson (1998) en la clasificación de las BL que recoge la Tabla 3 de la Introducción de esta memoria indica que, aunque la morfología es una característica cuya utilización es muy cuestionable en taxonomía bacteriana, es todavía un criterio utilizado en la asignación a género de este grupo de bacterias, en el que sólo los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* presentan morfología bacilar. Este y otros autores (Collins et al., 1987) indican asimismo que las carnobacterias se aíslan casi exclusivamente en carne y productos cárnicos donde son capaces de proliferar incluso a bajas temperaturas, motivo por el que asignamos todos los aislados de este estudio al género *Lactobacillus*.

La Tabla 1.1 recoge los resultados de las pruebas bioquímicas y de los ensayos de crecimiento efectuados para la identificación de los aislados que permitieron su agrupamiento en 7 grupos (A-G), perfectamente diferenciables.

Los aislados incluidos en el grupo G (12 aislados) fueron aquellos que mostraron un perfil de carbohidratos de difícil interpretación y poco reproducible, las pruebas bioquímicas fueron variables y no concluyentes. Alguno de ellos no fermentaba la glucosa, por lo que no fue posible realizar los ensayos de crecimiento. Ningún aislado de este grupo fue identificado con tiras API 50 CH. A los aislados incluidos en este grupo se los designó como *Lactobacillus* ssp.

TABLA 1.1. Resultados de las pruebas bioquímicas y de los ensayos de crecimiento

GRUPO	A	B	C	D	E	F
Nº AISLADOS	36	45	7	10	22	14
Morfología	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar	Bacilar
CO ₂ a partir de glucosa	–	–	–	+	+	+
NH ₃ a partir de arginina	–	–	–	20	82(18)	+
Crecimiento a:						
5 °C	–	–	–	–	–	–
15 °C	+	+	+	80(20)	27	50
45 °C	56(25)	44(22)	+	70	+	+
Crecimiento con:						
4% NaCl	+	+	+	+	75(25)	+
6,5% NaCl	+	+	+	68(32)	27	(50)
8% NaCl	86(8)	80(16)	+	40	27	–
Fermentación de azúcares:						
Celobiosa	+	+	+	–	–	–
Trehalosa	+	+	+	–	27	–
Manitol	+	+	+	–	–	–
Sorbitol	+	+	+	–	–	–
L-Arabinosa	+	–	+	+	+	–
Lactosa	+	+	+	–	9	+
Melezitosa	+	–	29	–	–	–
Melibiosa	+	+	+	+	+	14
D-Rafinosa	+	97	+	–	+	–
D-Xilosa	–	–	+	+	77	+
Amigdalina	+	+	+	–	–	–
Galactosa	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	–	–	–
Ribosa	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	–	–	–
Sacarosa	+	+	+	–	+	+
Ramnosa	17(61)	4	43	–	–	–
Maltosa	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	–	–	–
Configuración ác. láctico	DL	DL	DL	DL	DL	DL
valor medio relación D/L	1,91 (4)*	1,11 (6)	1,25 (2)	0,84 (3)	1,12 (6)	1,09 (3)

Símbolos: +, reacción positiva; –, reacción negativa; 82, 82% de aislados reacción positiva; (18), 18% aislados reacción débil; DL, producen ácido láctico de las dos configuraciones

*Número de aislados para los que se ensayó la configuración del ácido láctico

Los resultados de los ensayos de fermentación con tiras API 50 CH efectuados al 20% de los aislados de los grupos (A-F), coincidieron en todos los casos con los obtenidos en las placas de microtitulación (Tabla 1.2).

TABLA 1.2. Perfiles bioquímicos obtenidos en las tiras API 50 CH

GRUPO	A	B	C	D	E	F
Glicerol	–	–	+	–	–	–
L-Arabinosa	+	–	+	+	+	–
D-Xilosa	–	–	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	–	–	+
Ramnosa	+	–	–	–	–	–
Manitol	+	+	+	–	–	–
Sorbitol	+	+	+	–	–	–
α -metil-D-glucósido	–	–	+	+	–	–
N-acetil glucosamina	+	+	+	+	–	–
Amigdalina	+	+	+	–	–	–
Arbutina	+	+	+	–	–	–
Esculina	+	+	+	–	–	–
Salicina	+	+	+	–	–	–
Celobiosa	+	+	+	–	–	–
Lactosa	+	+	+	–	–	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	50
Sacarosa	+	+	+	–	+	+
Trehalosa	+	+	+	–	50	–
Melezitosa	+	–	–	–	–	–
D-Rafinosa	+	+	+	–	+	–
β -gentibiosa	+	+	+	–	–	–
D-Turanosa	+	+	+	–	–	–
D-Arabitol	66	50	+	–	–	–
5 ceto-gluconato	–	–	–	+	+	+

Símbolos: ver Tabla 1.1. Todos los aislados ensayados fermentaron: Ribosa, Glucosa, Fructosa y Gluconato. Ningún aislado fermentó: Eritritol, D-Arabinosa, L-Xilosa, Adonitol, β -metil-xilosido, L-Sorbosa, Dulcitol, Inositol, α -metil-D-manósido, Inulina, Almidón, Glucógeno, Xilitol, D-Lixosa, D-Tagatosa, D-Fucosa, L-Fucosa, L-Arabitol y 2 ceto-gluconato.

Los aislados de los grupos A y B fueron identificados por el sistema APILAB Plus como pertenecientes a la especie *L. plantarum* biotipo 1. Presentaban un aspecto colonial muy característico, con colonias de forma redondeada, bordes enteros, convexas y de color blanco intenso sin brillo.

Sánchez et al. (2000) obtienen idénticos resultados, y describen el aislamiento de cepas de *L. plantarum* “atípicas” en muestras de salmuera de la fermentación de Berenjenas de Almagro.

Las diferencias más notables fueron que mientras los aislados del grupo A fermentaban la melezitosa y la arabinosa, los del grupo B no fermentaban

ninguno de estos dos azúcares. Hay que señalar que la no fermentación de la melezitosa, supuso un “test en contra” con respecto al perfil característico de la especie, por lo que dichos aislados fueron considerados “atípicos”. Kandler y Weiss (1986) indicaron que a pesar de que la fermentación de este azúcar es una característica que presentan la mayor parte de las cepas de esta especie, existe un pequeño porcentaje que no la comparten.

Otros autores (Johansson et al., 1995a; Roushdy et al., 1998) también han descrito el aislamiento de cepas de *L. plantarum* incapaces de fermentar la melezitosa en diversos productos fermentados.

Coincidiendo también con lo descrito por Sánchez et al. (2000) la mayoría de los aislados de estos grupos fueron capaces de crecer a 45 °C, en contra de los criterios que para esta especie definen Kandler y Weiss (1986). Otros autores (Hugas et al., 1993; Tamang y Sarkar, 1996) han descrito la existencia de cepas de *L. plantarum* que crecen a esta temperatura y lo justifican como una adaptación de las mismas a las condiciones de fermentación, indicando que esta característica debería ser considerada dependiente de cepa mas que de especie.

Los aislados del grupo C fueron muy similares a los de los grupos anteriores, excepto en que eran capaces de fermentar la xilosa y el glicerol y fueron identificados como *L. pentosus*. Durante muchos años ha existido una gran controversia sobre la posición taxonómica de un grupo de cepas del género *Lactobacillus* designadas como *L. pentosus* por Fred et al. (1921) por su capacidad para fermentar las pentosas. Dellaglio et al. (1975) las consideran “equivalentes” a *L. plantarum* y difícilmente diferenciables con ensayos clásicos, aunque genómicamente no relacionadas. Zaroni et al. (1987) llevan a cabo un exhaustivo estudio de hibridación ADN/ADN con el fin de reexaminar la interrelación genética entre ambas especies y concluyen que se trata de especies diferentes. Años más tarde, Collins et al. (1991) siguen cuestionando el mantenimiento de estas especies como distintas y separadas. Hasta el momento así son consideradas por el sistema informático de identificación API.

Los aislados de *L. plantarum* y *L. pentosus* destacaron por su capacidad para crecer en medios con un 8% (p/v) de NaCl, coincidiendo con lo descrito

por otros autores (Vaughn, 1985; Montaña et al., 1992; Samelis et al., 1994; Sánchez et al., 2000).

Los aislados del grupo D se caracterizaron por su morfología celular, pudiendo observarse en una misma preparación una mezcla de bacilos de distinta longitud, de poco grosor y en parejas o cadenas. Esta descripción coincide con la que Kandler y Weiss (1986) definen como “típica” de algunas especies de lactobacilos heterofermentadores como *L. fermentum* y *L. brevis*. El sistema APILAB PLUS permitió su asignación a la especie ***L. brevis* biotipo 3**. Una característica de los aislados de este grupo es que produjeron mayor cantidad del isómero L- del ácido láctico que del D- siendo por tanto < 1 la relación D/L.

Los aislados del grupo E fueron muy similares a los del grupo anterior, diferenciándose por su capacidad para fermentar la rafinosa y la sacarosa y fueron identificados como ***L. brevis* biotipo 2**. Es interesante resaltar que algunos de estos aislados fueron capaces de fermentar la trehalosa, lo que supuso un test en contra en la asignación a esta especie. Otros autores (Oyewole y Odunfa, 1990; Hounhouigan et al., 1993) han descrito la presencia de cepas de *L. brevis* biotipo 2 trehalosa positivos en otras fermentaciones espontáneas.

El grupo F fue el único que sólo incluyó aislados obtenidos de las salmueras de los fermentadores que contenían berenjenas no congeladas, y fueron identificados como ***L. fermentum***, aunque al contrario de lo definido para esta especie fermentaron la melibiosa y la rafinosa.

De estos resultados puede concluirse, en total coincidencia con lo indicado por Sánchez et al. (2000), que en el proceso de fermentación espontánea de las Berenjenas de Almagro, independientemente de que se utilicen o no frutos congelados, existe una escasa diversidad en cuanto a géneros participantes, a diferencia de lo que ocurre en otros procesos similares. Montaña et al. (1992) y Daeschel et al. (1987) describen en la elaboración de otros encurtidos, como los pepinillos, las aceitunas o la col fermentada es habitual la participación de diversas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*.

En la Figura 1.5 se ha representado el porcentaje de participación cada una de las especies identificadas en las salmueras de ambas fermentaciones.

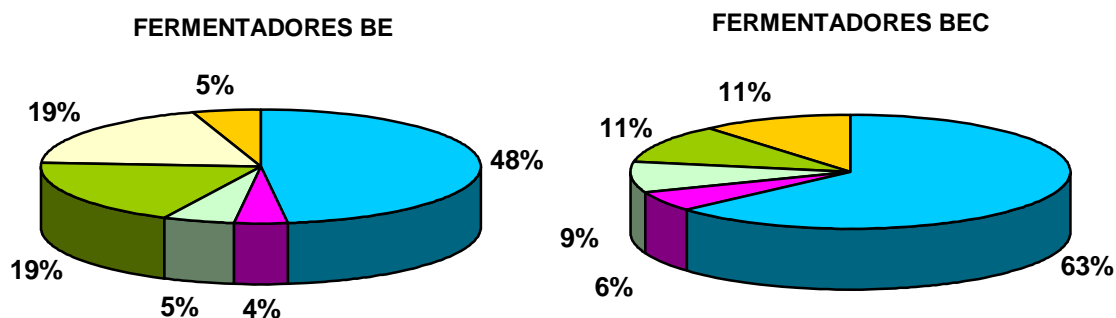
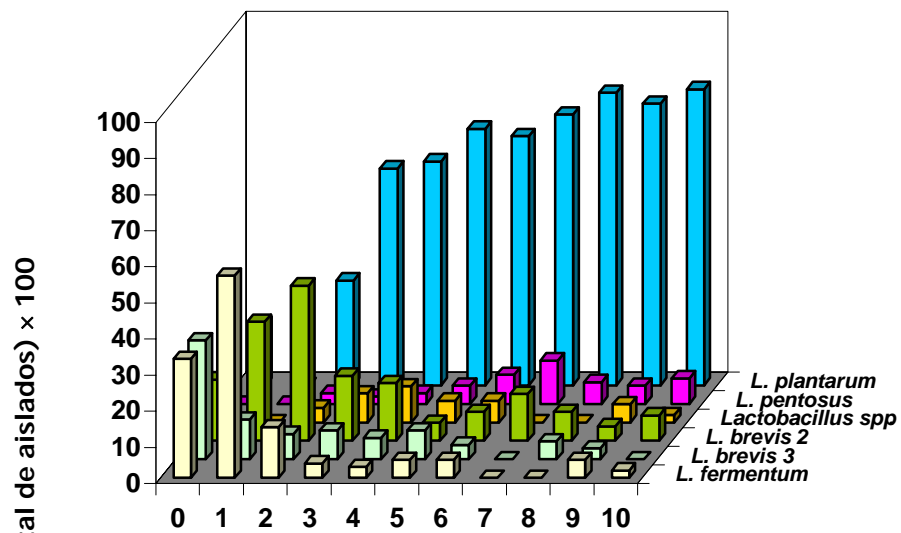


FIGURA 1.5. Porcentajes de participación de las especies identificadas ■ *L. plantarum* biotipo ■ *L. pentosus* ■ *L. brevis* biotipo 3 ■ *L. brevis* biotipo 2 ■ *L. fermentum* ■ *Lactobacillus* spp.

En ambos casos se observó un claro predominio de la especie *L. plantarum* siendo la diferencia más notable la ausencia de *L. fermentum* en los fermentadores que contenían berenjenas congeladas. Podría entonces concluirse que de las especies de *Lactobacillus* participantes en la fermentación espontánea de las berenjenas de Almagro, *L. plantarum* es la más resistente a la congelación, y *L. fermentum* y *L. brevis* biotipo 2 por el contrario las más afectadas. La morfología celular, bacilos largos y delgados, de estas especies, podría explicar su mayor susceptibilidad al daño por frío.

La evolución de las especies en ambas fermentaciones se muestra en la Figura 1.6.

FERMENTADORES CON BERENJENAS ESCALDADAS (BE)



FERMENTADORES CON BERENJENAS ESCALDADAS CONGELADAS (BEC)

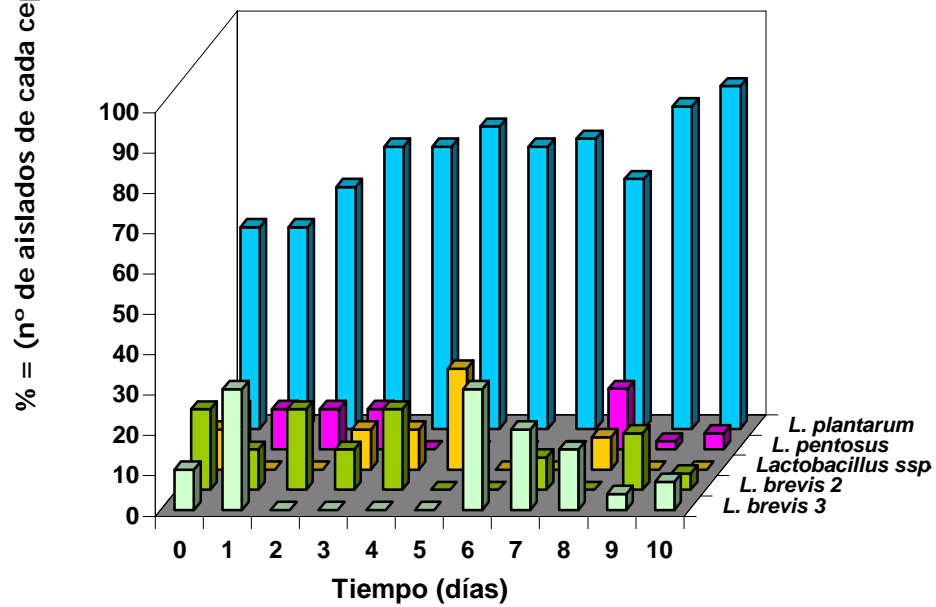


FIGURA 1.6. Sucesión de las especies durante las fermentaciones

En ambos procesos la evolución de las especies fue muy similar observándose un claro predominio de la especie *L. plantarum*. Todas estuvieron presentes en la salmuera desde el inicio de la fermentación, a excepción de *L. pentosus* en los fermentadores con BE.

Tamang y Sarkar (1996) observaron una secuencia similar en la fermentación de la caña de bambú, indicando que el rápido crecimiento inicial de las especies heterofermentadoras, como *L. brevis* y *L. fermentum*, origina una caída del pH del medio y crea una atmósfera con baja concentración de oxígeno, condiciones que favorecen el crecimiento de *L. plantarum*.

La presencia e incluso el predominio de *L. plantarum* no resulta nada extraño porque, como es bien sabido, esta especie forma parte de la microbiota epifítica de diversas especies vegetales (Kandler y Weiss, 1986; Daeschel et al., 1987; Vescovo et al., 1993). Además, su capacidad para mantener un gradiente de pH adecuado en presencia de elevadas concentraciones de ácidos orgánicos (mayor ácido-tolerancia) (Fleming y McFeeters, 1981) y su habilidad para utilizar otros sustratos (por ejemplo dextrinas) tras el agotamiento de los azúcares fermentables (Oyewole y Odunfa, 1990) pueden explicar que sea la especie predominante en la etapa final de la fermentación de muchos vegetales y cereales (Fleming y McFeeters, 1981; McDonald et al., 1990; Oyewole y Odunfa, 1990; Rodrigo y Martínez, 1991; Brauman et al., 1996; Kofi et al., 1996; Mugula et al., 2003). Son muchos los autores que afirman que de todas las BL presentes en las salmueras de fermentación de vegetales, la más ácido-tolerante es *L. plantarum*, siendo por ello la que con mayor frecuencia se aísla al final del proceso (Fleming y Mc Feeters, 1981; Rodrigo y Martínez, 1991).

La presencia de otras especies del género *Lactobacillus*, como *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. pentosus*, también ha sido descrita en la fermentación de otros vegetales (aceitunas, pepinillos), y en condimentos y productos fermentados de origen indígena (Pederson, 1979; Sharpe, 1981; Steinkraus, 1983; Cooke et al., 1987; Hammes y Vogel, 1995; Kofi et al., 1996; Steinkraus, 1996; Oliver et al., 2000; Omar et al., 2000; Leisner et al., 2001).

1.3.3. Análisis sensorial

De la relación de descriptores generados por los catadores durante su entrenamiento, se seleccionaron por consenso 15 (Figura 1.7) que fueron los que su criterio mejor definían las características sensoriales de las berenjenas y aparecían con mayor frecuencia. Dos de ellos, la intensidad de color verde y el brillo, describían la sensación visual, 4, el olor a vinagre, el olor a especias y la intensidad y la calidad de la sensación olfativa, la sensación olfativa, 2, la dureza y la gomosidad, la sensación táctil y 6, sabor a especias, los sabores salado, picante y ácido y la intensidad y la calidad del deajo, para la sensación gustativa. El último de los descriptores, la impresión global, integraba todos los anteriores. Con estos atributos se confeccionó la hoja de cata que se utilizó en la evaluación de las Berenjenas de Almagro.

Cabe destacar que la definición de los atributos que caracterizan sensorialmente este producto será de gran utilidad no sólo para nuestros futuros estudios, sino que también podría serlo, como para el Consejo Regulador de la IGP “Berenjena de Almagro” que, como ya hemos indicado, se encuentra actualmente diseñando una hoja de cata “normalizada” para llevar a cabo la evaluación sensorial de las Berenjenas acogidas a esta IGP.

El análisis sensorial de las Berenjenas de Almagro no fue una tarea fácil por los numerosos atributos que deben ser evaluados y por las diferencias que estos presentan. Así, mientras que algunos de ellos es deseable que estén presentes con gran intensidad en las Berenjenas consideradas de calidad, como por ejemplo todos los relacionados con el aroma, otros deben aparecer débilmente, como por ejemplo el sabor salado o picante, y otros por el contrario es preferible que no aparezcan, como por ejemplo la gomosidad.

En la Figura 1.7 se ha representado en un diagrama de “tela de araña” el perfil sensorial de las Berenjenas evaluadas, según los resultados obtenidos en el análisis sensorial descriptivo.

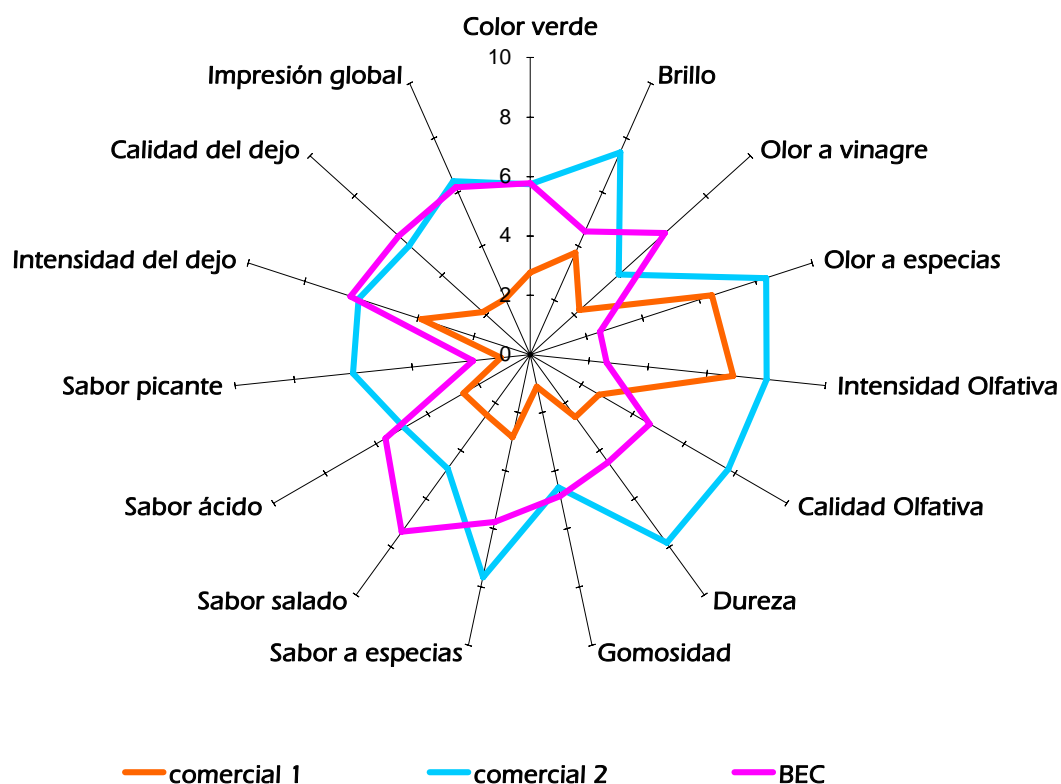


FIGURA 1.7. Representación de las puntuaciones medias para cada atributo obtenidas en el análisis sensorial descriptivo

Las Berenjenas elaboradas con frutos congelados (BEC) fueron juzgadas favorablemente y obtuvieron en el atributo impresión global una puntuación casi idéntica a la de las comerciales 2, comerciales mejor valoradas, lo que permite afirmar que el proceso de congelación no afecta de forma negativa y significativamente a la aceptación sensorial de las mismas. Ambas obtuvieron puntuaciones muy parecidas en los atributos color, sabor ácido, intensidad y calidad del deajo y gomosidad, aunque las BEC fueron consideradas menos duras que las comerciales 2 lo que con toda probabilidad podría estar relacionado con la congelación del fruto.

Los resultados de la aplicación del test de Student-Newman-Keuls a las puntuaciones otorgadas por los catadores en el análisis descriptivo se recogen en la Tabla 1.3.

TABLA 1.3. Resultados del test de Student-Newman-Keuls

ATRIBUTOS	Comercial 1	Comercial 2	BEC
Color Verde	2,77 ^a	5,74 ^b	5,80 ^b
Brillo	3,76 ^a	7,45 ^b	4,54 ^c
Olor a Vinagre	2,23 ^a	4,02 ^b	6,11 ^c
Olor a Especies	6,46 ^a	8,36 ^b	2,47 ^c
Intensidad Olfativa	6,87 ^a	8,02 ^b	2,6 ^c
Calidad Olfativa	2,67 ^a	7,71 ^b	4,66 ^c
Dureza	2,60 ^a	7,83 ^b	4,47 ^c
Gomosidad	1,10 ^a	4,58 ^b	4,87 ^b
Sabor a Especies	2,86 ^a	7,67 ^b	5,74 ^c
Salado	2,51 ^a	4,74 ^b	7,37 ^c
Ácido	2,60 ^a	4,90 ^b	5,63 ^b
Picante	0,99 ^a	6,00 ^b	1,94 ^a
Intensidad del Dejo	3,86 ^a	6,08 ^b	6,40 ^b
Calidad del Dejo	2,16 ^a	5,49 ^b	6,00 ^b
Impresión Global	2,04 ^a	6,39 ^b	6,20 ^b

a,b,c, Diferentes índices significa que existen diferencias estadísticamente significativas siendo $\alpha \leq 0,05$

Las Berenjenas elaboradas con frutos congelados obtuvieron puntuaciones estadísticamente diferentes a las comerciales 2 para los 4 atributos relacionados con la sensación olfativa y para 4 de los 6 atributos relacionados con la sensación gustativa, lo que es difícilmente explicable ya que las salmueras de fermentación y el líquido de gobierno utilizados fueron los

misimos que los de las comerciales 2 que eran elaboradas en la empresa donde realizamos nuestros ensayos.

Las muestras comerciales presentaron diferencias significativas en todos los atributos evaluados y obtuvieron una puntuación muy distinta en la impresión global. En alguno de los atributos evaluados las muestras comerciales 1 fueron consideradas “poco adecuadas”. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ballesteros (1996) y ponen de manifiesto una vez más las grandes diferencias existentes en el producto del mercado.

El test de Friedman´s al ser aplicado a las respuestas de la prueba de preferencia, reveló una preferencia altamente significativa entre las diferentes muestras ($\alpha \leq 0,05$). Los valores de LSD calculados, indicaron que no había diferencias significativas entre las Berenjenas BCE y las comerciales 2, mientras que ambas eran significativamente preferidas a las comerciales 1 (Tabla 1.4).

TABLA 1.4. Resultados de la prueba de preferencia

	Comercial 1	Comercial 2	BEC
Preferencia⁽¹⁾	0	8	14
Puntuación final⁽²⁾	62 ^b	39 ^a	31 ^a

(1) no. de veces considerada “la más preferida”

(2) “mas preferida”=+1, “preferencia intermedia”=+2, “menos preferida”=+3.

^{a,b} Diferentes índices significa diferencias estadísticamente significativas siendo $\alpha \leq 0,05$

Estos resultados confirman lo anteriormente indicado en el análisis descriptivo, y permiten concluir que la congelación no sólo no afecta de forma negativa sino que las Berenjenas elaboradas con frutos congelados fueron preferidas por la mayoría de los consumidores.

1.4. CONCLUSIONES

De los resultados de este estudio puede concluirse que:

✓ El curso de la fermentación cuando se utilizan frutos congelados es similar a aquel de la fermentación con frutos no congelados, si bien ocurre un ligero retraso en el inicio de la etapa de fermentación vigorosa y en la finalización de la fermentación, lo que podría evitarse con la utilización de un cultivo iniciador.

✓ La microbiota láctica participante en ambos procesos fue muy similar, a excepción de la especie *L. fermentum* que estuvo ausente cuando se utilizaron frutos congelados, lo que podría atribuirse al efecto de la congelación.

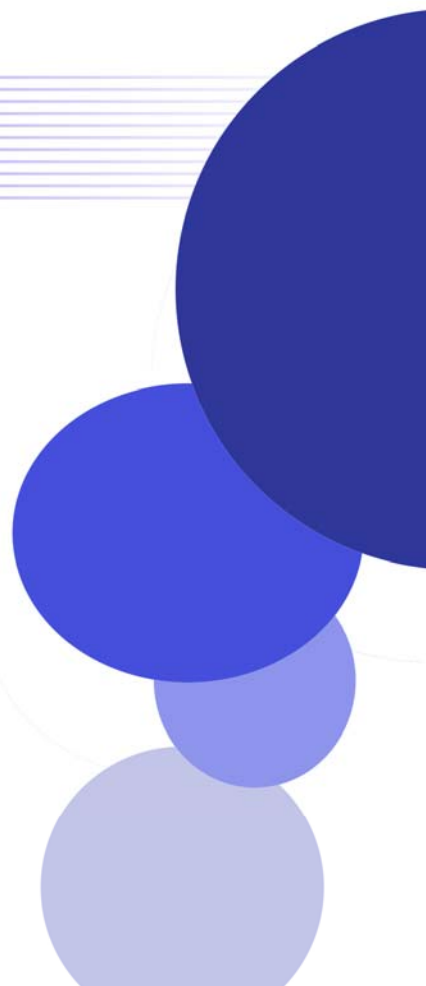
✓ La congelación de los frutos no produce un efecto adverso en las características sensoriales de las Berenjenas, a pesar de las diferencias mostradas en algunos de los atributos. Por el contrario las Berenjenas elaboradas con frutos congelados, fueron significativamente preferidas a una de las comerciales. A pesar de ello, se ha puesto de manifiesto que la congelación afecta a la dureza de los frutos por lo que es aconsejable que se optimicen las condiciones del proceso.

✓ La selección de los atributos a evaluar en el análisis descriptivo de la Berenjena de Almagro ha permitido la preparación de una hoja de cata cuya finalidad en futuros estudios y creemos que para el Consejo Regulador de la IGP "Berenjena de Almagro", es indudable.

Capítulo 2

A series of horizontal lines of varying lengths and shades of purple, creating a sense of motion or a stylized underline.

**Estudio de la influencia de la
utilización de cultivos
iniciadores en la fermentación
y en las características
sensoriales de las Berenjenas
de Almagro**



2.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descrito en la Introducción general de esta memoria, la adición de cultivos iniciadores previamente seleccionados y adaptados a las condiciones de elaboración de un producto, es en muchos casos una buena alternativa a las prácticas de elaboración tradicionales. Su utilización es habitual en la elaboración de diversos productos como los lácteos, los cárnicos o el vino, y en el caso de los encurtidos, se han utilizado en la elaboración de pepinillos, col fermentada y aceitunas.

Ballesteros et al. (1999) en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio observaron que la utilización de un cultivo iniciador comercial en la fermentación de Berenjenas de Almagro, aunque aceleraba el proceso fermentativo, proporcionaba a las Berenjenas un intenso sabor amargo, que las hacía inaceptables para el consumo. Los autores indicaron que este problema se resolvería utilizando un cultivo iniciador propio, preparado con cepas seleccionadas de entre aquellas que participan en las fermentaciones espontáneas.

Los resultados del estudio realizado con berenjenas congeladas, recogidos en el capítulo anterior, apuntaban también a la conveniencia de utilizar un cultivo iniciador como solución al retraso en la fermentación ocasionado por el efecto del frío en la microbiota láctica espontánea. Por este motivo, y antes de realizar el proceso de selección nos planteamos llevar a cabo un estudio para conocer 1) el comportamiento de algunos aislados cuando eran utilizados como cultivos iniciadores 2) si se producía o no una mejora del proceso y 3) la influencia de la utilización de cultivos iniciadores propios en las características sensoriales de las Berenjenas.

Sánchez et al. (2000) describieron que en la primera etapa de la fermentación de las Berenjenas de Almagro predominan las especies heterofermentadoras obligadas *L. fermentum* y *L. brevis*, mientras que en la etapa final es la especie *L. plantarum*, la predominante, resultados estos que han sido confirmados en el estudio recogido en el Capítulo anterior.

Capítulo 2

Atendiendo a estos resultados, en este estudio se ensayarán tres cultivos iniciadores preparados con cepas de las especies *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. brevis* tomadas al azar.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1. Material

Se utilizaron berenjenas de tamaño medio (34-44g) que fueron acondicionadas como se describe en el Capítulo anterior.

2.2.2. Diseño experimental

Este estudio se realizó en las instalaciones de la planta piloto de la Facultad de Químicas de la UCLM.

Para el escaldado de las berenjenas, se introdujeron lotes de 1,5 Kg en recipientes metálicos de 5 L de capacidad que contenían 4 L de agua con 0,05 % (p/v) de ácido cítrico, a temperatura ambiente. El agua se calentaba hasta ebullición, manteniéndose en estas condiciones durante 5 minutos. Seguidamente las berenjenas se enfriaban por inmersión en agua fría.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en recipientes rectangulares (30×22×15 cm) de plástico de 8 L de capacidad abiertos por la parte superior, que contenían 4L de salmuera y 1,5 Kg de berenjenas. La composición de la salmuera fue muy similar a la que se utiliza habitualmente en la industria: 8% (v/v) de vinagre comercial (6% de ácido acético), 0,05% (v/v) de Tween 80, 0,07% (p/v) de ácido cítrico, 3,96% de sal molida, aditivos y saborizantes (ajo, cominos, pimentón y colorante). El pH de la salmuera era de 2,7. Durante la fermentación, se colocaba una falsa tapa de metacrilato agujereada, para mantener las berenjenas sumergidas en la salmuera.

Para preparar los cultivos iniciadores, se utilizaron 3 aislados tomados al azar de entre los obtenidos en estudios anteriores: cepa 7G2 de *L. brevis* biotipo 2, cepa 4G1 de *L. plantarum* biotipo 1 y cepa 2G2 de *L. fermentum*. Estos se conservaban en forma liofilizada.

Se prepararon 6 fermentadores que fueron inoculados por duplicado con los siguientes cultivos:

- Cultivo 1 (lote F1) contenía las cepas 7G2 y 4G1 a partes iguales
- Cultivo 2 (lote F2) contenía las cepas 2G2 y 4G1 a partes iguales
- Cultivo 3 (lote F3) que contenía una mezcla de las 3 cepas a partes iguales

y un cuarto lote F4 que no fue inoculado y que se usó como control de la fermentación.

Cuarenta y ocho horas después de introducir las berenjenas en la salmuera, los fermentadores fueron inoculados con la cantidad apropiada de cada liófilo para alcanzar una concentración teórica final en la salmuera de aproximadamente 10^7 células/mL. Los liófilos fueron resuspendidos en un pequeño volumen de salmuera y se dejaron rehidratar durante unos 30 minutos antes de ser añadidos al fermentador. Tras la inoculación los fermentadores fueron agitados manualmente para una mejor distribución del inóculo.

Las berenjenas fueron dejadas fermentar durante 12 días a una temperatura controlada de 32 ± 2 °C. Para el control de la fermentación se tomaron muestras diarias de salmuera, como se ha descrito en el Capítulo anterior.

Tras la finalización de las fermentaciones, se añadió metabisulfito sódico en una concentración del 0,03% (p/v), transcurridas 24 h, las berenjenas se envasaron en botes de medio kilo en las instalaciones de una empresa elaboradora, que ha colaborado con frecuencia en nuestras investigaciones.

2.2.3. Métodos

2.2.3.1. Análisis químico

Se realizaron las mismas determinaciones que en el estudio del Capítulo anterior con la misma metodología. En esta ocasión se determinó además el contenido en NaCl en la salmuera utilizando el método de Möhr. En este se realiza una valoración de los cloruros en medio básico, con nitrato de plata 0,1N

y con cromato potásico como indicador. El punto final de la valoración se evidencia por el cambio del color amarillo de la solución a naranja.

2.2.3.2. Análisis microbiológico

Para los recuentos de BL se utilizó agar MRS tal y como se ha descrito en el Capítulo 1.

2.2.3.3. Análisis sensorial

Dos meses después del envasado, las Berenjenas fermentadas en este estudio junto con otras comerciales, fueron evaluadas sensorialmente, realizándose un análisis descriptivo con catadores, en el que se utilizó la ficha de cata diseñada en el estudio del Capítulo anterior y una prueba de preferencia con consumidores.

2.2.3.4. Análisis estadístico de los resultados

Se aplicó el test de Student-Newman-Keuls, a los resultados del análisis descriptivo, usando un nivel de significación de $\alpha \leq 0,05$.

El test de Friedman (O'Mahony, 1986) usando un nivel de significación de $\alpha \leq 0,05$ fue aplicado a los resultados del test hedónico. Se calcularon los valores de la mínima diferencia significativa (LSD "least significant difference").

A los datos obtenidos en el análisis descriptivo se les aplicó un análisis estadístico multivariante, el Análisis de Componentes Principales (ACP).

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico SPSS para Windows (versión 10.0) (SPSS, 2000).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Evolución de la fermentación

La Figura 2.1 muestra la evolución de los parámetros físico-químicos y de los recuentos obtenidos durante las fermentaciones. Los valores representados son la media de los obtenidos en las muestras tomadas de cada fermentador.

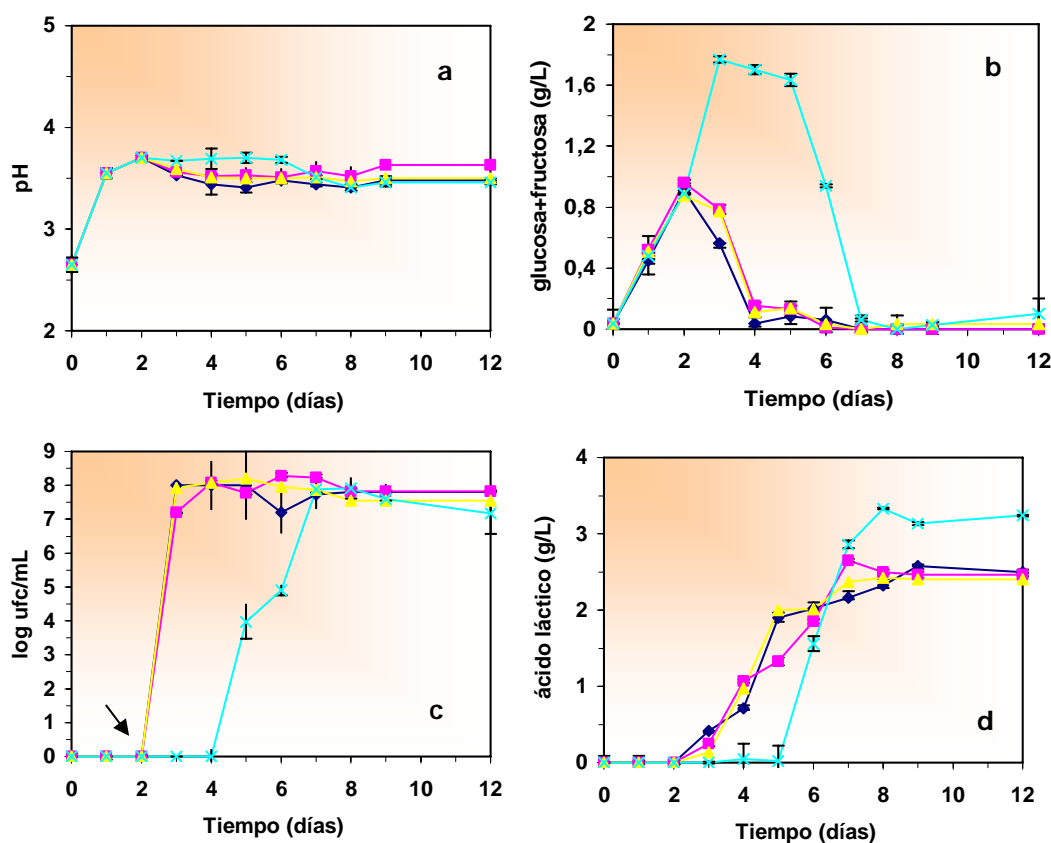


FIGURA 2.1. Evolución de la fermentación. ◆ Lote F1 (*L. brevis*+ *L. plantarum*); ■ Lote F2 (*L. fermentum*+*L. plantarum*); ▲ Lote F3 (*L. brevis*+*L. plantarum*+*L. fermentum*); × Lote F4 no inoculados. a: pH, b: Concentración de Glucosa + Fructosa c: Recuento de bacterias lácticas., d: Concentración de ácido láctico. ↘ Inoculación

La evolución de los parámetros físico-químicos y microbiológicos fue la habitual en este tipo de procesos. El comportamiento de los fermentadores inoculados fue muy similar entre si y al descrito por Ballesteros et al. (1999), cuando los autores utilizaban en sus fermentaciones salmueras con concentraciones de cloruro sódico del 4 y del 6%. No obstante, en este estudio ocurrió un retraso en el inicio de la fase vigorosa de la fermentación que puede ser debido a la diferente concentración de inóculo utilizada.

La difusión de los azúcares desde los frutos a la salmuera (Figura 2.1 b), en las horas previas a la inoculación siguió una evolución idéntica a la observada en el estudio del Capítulo anterior, pero tras inocular se observó un descenso brusco en el contenido de azúcares y casi simultáneamente la aparición de ácido láctico (Figura 2.1 d). En el caso de los fermentadores no inoculados del lote F4 los niveles de azúcares alcanzados en la salmuera fueron superiores, como consecuencia del retraso en el inicio de la fermentación. En todos los casos el pH de la salmuera al final de la fermentación (Figura 2.1 a), aunque superior al valor inicial, fue lo suficientemente bajo como para asegurar la conservación del producto. Entre un 58 y un 66% del ácido láctico producido correspondía a la forma D(-)-láctico.

TABLA 2.1. Concentración de sal en las salmueras durante la fermentación (g/L)

Lote	Día de Fermentación										
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	11	12
F1	37,7 [*]	26,1	26,9	27,5	26,9	28,6	25,5	25,5	25,2	25,0	25,0
F2	37,7	25,8	26,7	27,1	24,6	24,6	24,6	24,3	25,2	25,0	25,0
F3	37,7	26,5	27,1	27,8	24,6	26,6	28,1	28,1	27,5	27,0	27,0
F4	37,7	26,0	26,5	24,9	27,2	28,4	26,3	26,0	25,5	26,6	26,6

* Valores medios de los 2 fermentadores de cada lote y de los duplicados de las determinaciones

La concentración de sal en las salmueras (Tabla 2.1), descendía bruscamente durante las primeras 24 horas, como consecuencia del intercambio que se establece con los frutos, estabilizándose mas tarde en torno a los 25-27 g/L.

Los recuentos de bacterias lácticas alcanzaron valores en torno a las 10^8 ufc/mL si bien, mientras que en los fermentadores inoculados, el incremento se producía inmediatamente después de la inoculación, en los fermentadores no inoculados ocurría 4 días más tarde (Figura 2.1 c).

2.3.2. Análisis sensorial

Las puntuaciones medias obtenidas para cada uno de los atributos y para cada lote han sido representadas en un diagrama en tela de araña (Figura 2.2). Las Berenjenas de los lotes F1 y F3 recibieron puntuaciones parecidas y al obtener una mayor puntuación en el atributo **impresión global** que las del lote F2 y que las comerciales, fueron consideradas de mayor calidad. Las Berenjenas comerciales recibieron mejores puntuaciones en algunos de los atributos como la dureza y el brillo, más relacionados con aspectos tecnológicos del proceso, como el escaldado, que con aspectos microbiológicos.

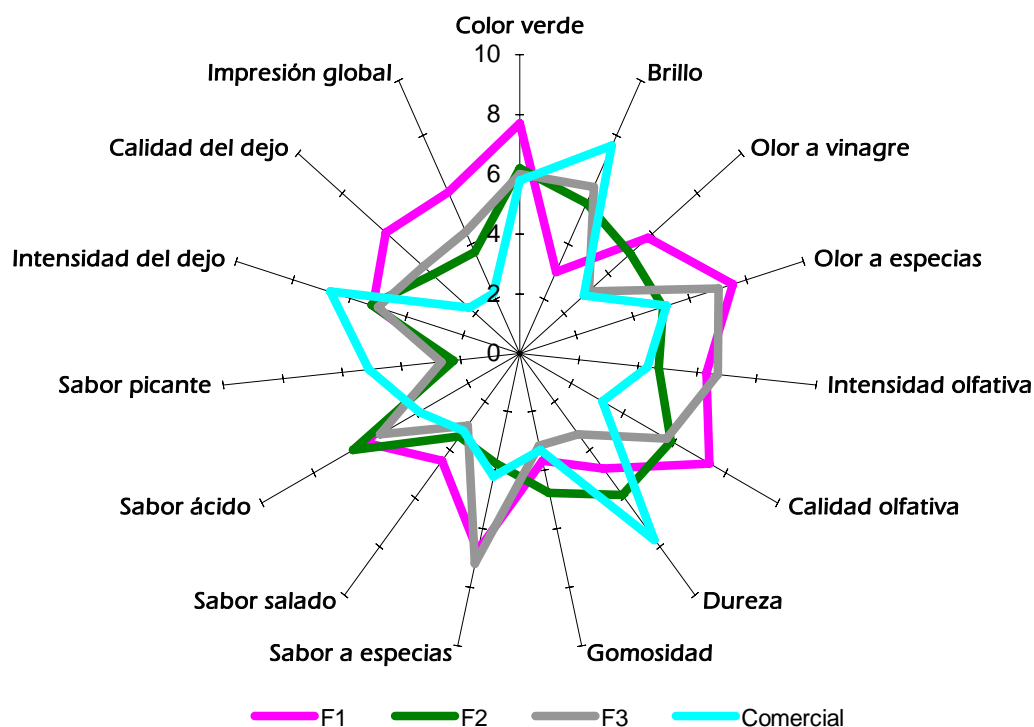


FIGURA 2.2. Perfil sensorial de las berenjenas fermentadas con los diferentes cultivos iniciadores y de otras comerciales

Los resultados del test de Student-Newman-Keuls (Tabla 2.2) pusieron de manifiesto que para 8 de los 15 atributos evaluados no existían diferencias significativas entre las Berenjenas de los lotes F1 y F3.

TABLA 2.2. Puntuaciones medias de los atributos evaluados y significación de las diferencias según el test de Student-Newman-Keuls

ATRIBUTOS	F1	F2	F3	Comercial
Color Verde	7,7 ^a	6,2 ^b	6,0 ^c	5,8 ^d
Brillo	3,0 ^a	5,5 ^b	6,1 ^b	7,6 ^c
Olor a Vinagre	5,8 ^a	5,0 ^a	3,1 ^b	2,9 ^b
Olor a Especias	7,5 ^a	5,1 ^b	7,0 ^a	5,2 ^a
Intensidad Olfativa	6,3 ^a	4,7 ^b	6,7 ^a	4,3 ^b
Calidad Olfativa	7,4 ^a	5,9 ^a	5,7 ^a	3,2 ^b
Dureza	4,8 ^a	5,9 ^a	3,4 ^b	7,7 ^c
Gomosidad	3,7 ^a	4,8 ^a	3,2 ^a	3,3 ^a
Sabor a Especias	6,8 ^a	3,8 ^b	7,2 ^a	4,2 ^b
Sabor Salado	4,5 ^a	3,5 ^b	3,0 ^b	3,2 ^b
Sabor Ácido	6,0 ^a	6,5 ^a	5,4 ^{ab}	3,9 ^b
Sabor Picante	2,4 ^a	2,3 ^a	2,7 ^b	5,1 ^b
Intensidad del Dejo	5,2 ^a	5,3 ^a	5,0 ^a	6,7 ^b
Calidad del Dejo	6,1 ^a	4,0 ^b	4,4 ^b	2,3 ^c
Impresión Global	5,9 ^a	3,7 ^b	4,5 ^a	2,2 ^b

a,b,c,d Diferentes índices significan que existen diferencias estadísticamente significativas siendo $\alpha \leq 0,05$

Cuando se aplicó el análisis de componentes principales (Figura 2.3) se encontró que los 3 primeros componentes explicaban el 90% de la varianza. Los atributos intensidad del aroma y sabor picante se correlacionaban de forma positiva con el CP1 y explicaban el 35,3% de la varianza, mientras que la dureza

se correlacionaba de forma negativa con este componente principal. Los atributos color verde, sabor salado y olor a vinagre se correlacionaban de forma positiva con el CP2 y explicaban el 32% de la varianza.

La representación de las muestras en el plano definido por CP1 y CP2 (Figura 2.3) muestra que las Berenjenas de los lotes F1 y F3 se distribuyeron en la parte positiva del CP1 y las de los lotes F2 y comerciales se distribuyeron en la parte negativa de este componente y muy agrupadas entre sí. Las Berenjenas del lote F1 presentaban un sabor y un color verde más intenso y un mayor sabor salado y olor a vinagre. La presencia en las Berenjenas de estos lotes de algún/os metabolito/s producido/s por las cepas integrantes del cultivo iniciador podría explicar alguno de estos resultados.

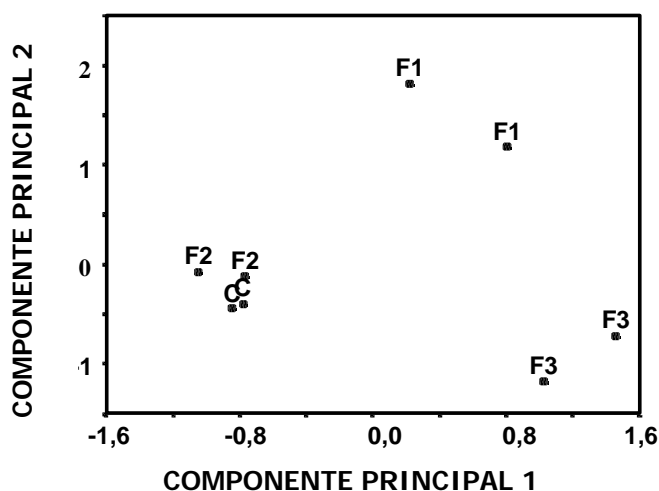


FIGURA 2.3. Proyección de las muestras en el plano definido por el CP1 y el CP2

Los resultados del test hedónico se recogen en la Tabla 2.3. El test de Friedman 's indicó diferencias altamente significativas entre los lotes y al aplicar el análisis LSD resultó que la preferencia era altamente significativa para los lotes F1 y F3 aunque no hubo diferencia en la preferencia entre ambos. Las Berenjenas comerciales fueron las menos preferidas.

TABLA 2.3. Resultados de la prueba de preferencia

	F1	F2	F3	Comercial
Preferencia⁽¹⁾	11	5	14	3
Puntuación final⁽²⁾	53 ^a	70 ^{bc}	48 ^{ab}	89 ^c

(1) no. de veces considerada “la más preferida”

(2) “mas preferida”=+1, “preferencia intermedia”=+2, “menos preferida”=+3.

^{a,b,c} Diferentes índices significa diferencias estadísticamente significativas siendo $\alpha \leq 0.05$

La semejanza de los resultados obtenidos para las Berenjenas de los lotes F1, inoculados con *L. brevis* y *L. plantarum*, y F3, inoculados con *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. fermentum*, podría ser atribuida a la “no implantación” de la cepa de *L. fermentum* en la fermentación aspecto este que debería ser confirmado. Este hecho explicaría también las bajas puntuaciones obtenidas por las berenjenas del lote F2, ya que como ya indicaron Ballesteros et al. (1999), la sola presencia de *L. plantarum* en el proceso aporta un sabor amargo poco deseable en los frutos, que los catadores definían como “poco característico” de este producto. La contribución de la especie *L. brevis*, parece ser importante ya que evita de alguna forma la aparición del sabor amargo producido por *L. plantarum*.

Es importante indicar que, a pesar de que en los inóculos se utilizaron especies heterofermentadoras, no se observaron problemas de “daños gaseosos”, habituales en las fermentaciones de vegetales en las que se utilizan estas especies (Rodrigo et al., 1992).

Los resultados de este estudio confirman que la elección de las especies integrantes de un cultivo iniciador es esencial, por la distinta contribución de las mismas a las características organolépticas de los productos fermentados, a pesar de que no se observen diferencias en la evolución de los procesos.

Asimismo, ponen de manifiesto la necesidad de utilizar algún sistema que permita la monitorización de la implantación de las cepas inoculadas durante la fermentación, para conocer la verdadera contribución de las mismas.

2.4. CONCLUSIONES

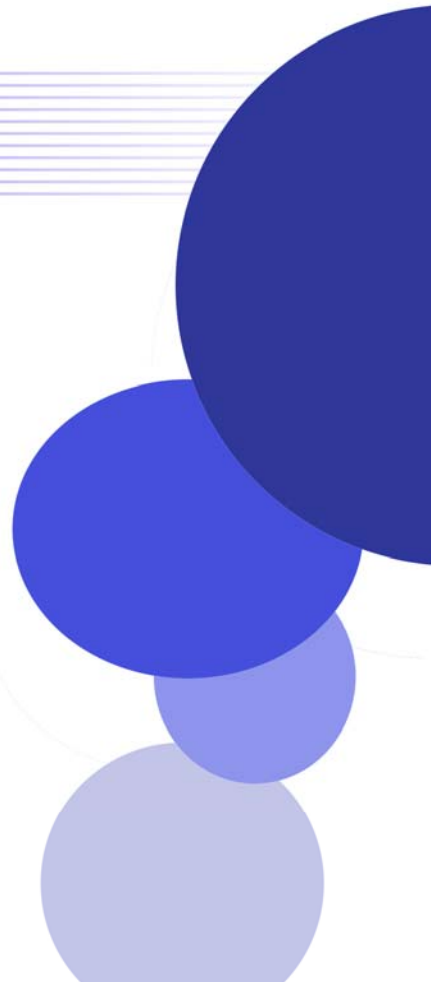
De los resultados anteriormente expuestos puede concluirse que:

- ✓ La adición de cultivos iniciadores supone importantes ventajas, ya que la fermentación transcurre de forma más rápida y finaliza algunos días antes. Además, en algunos casos, las berenjenas obtenidas presentan mejores características organolépticas que las comerciales.
- ✓ Parece importante la presencia en el cultivo iniciador de una especie heterofermentadora obligada como *L. brevis*, ya que proporciona al producto características sensoriales muy apreciadas.
- ✓ Para conocer la presencia real de las cepas inoculadas y su contribución en el proceso y en las características organolépticas de las Berenjenas fermentadas, es necesaria la utilización de algún método, como los de caracterización molecular, que permita determinar en cada momento su participación.

Capítulo 3

A series of horizontal lines of varying lengths and shades of purple, creating a sense of motion or a stylized underline.

**Selección de un cultivo
iniciador para la fermentación
dirigida de Berenjenas de
Almagro y estudio de su
capacidad de implantación
utilizando la técnica
RAPD-PCR**



3.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de selección de un cultivo iniciador para la elaboración de un alimento, es complejo y requiere no sólo del conocimiento previo de la microbiota que participa en el proceso espontáneo sino también de la caracterización tecnológica y/o fisiológica de las cepas predominantes, al objeto de seleccionar aquellas que presenten las mejores propiedades para ser utilizadas industrialmente (Daeschel y Fleming, 1984; Ruiz-Barba et al., 1994; Kimaryo et al., 2000; Vogel et al., 2002). De esta forma, podrán conseguirse mejoras en el proceso manteniendo los rasgos típicos y las cualidades organolépticas del producto.

Las propiedades deseables en las cepas que vayan a ser incluidas en un cultivo iniciador, variaran con el tipo de proceso y con el producto que vaya a ser elaborado. Así por ejemplo, mientras que para productos lácteos es esencial que las cepas posean una adecuada capacidad acidificante y proteolítica (Quiberoni et al., 1998), en el caso de los productos cárnicos es fundamental que no produzcan aminas biógenas (Silla Santos, 1998; Erkkilä et al., 2001).

Una vez realizada la selección será necesario estudiar su capacidad de implantación tanto a escala de laboratorio como en la industria y para ello será necesaria la utilización de algún método capaz de distinguir específicamente y de forma inequívoca (Ramos y Harlander, 1990) las cepas inoculadas.

Los resultados obtenidos en los estudios anteriores apuntaban a la conveniencia de utilizar cultivos iniciadores propios para la elaboración de Berenjenas de Almagro, motivo por el que nos planteamos la necesidad de realizar un proceso de selección entre las cepas que habían sido obtenidas y caracterizadas anteriormente en nuestro laboratorio (Sánchez et al., 2000, 2003, 2004).

Para la elección de las propiedades que debían ser ensayadas se tuvo en consideración por un lado, que la elaboración de Berenjenas de Almagro es un proceso “abierto” en el que no se esterilizan ni la materia prima, que tan sólo es sometida a un ligero escaldado, ni los utensilios y por otro la naturaleza del producto. Por ello, uno de los primeros ensayos realizados fue la determinación de la capacidad bacteriocinogénica y la producción de peróxido de hidrógeno. La

capacidad para producir alguna de estas sustancias con actividad antimicrobiana facilitaría su implantación en el proceso a pesar de la competencia de la microbiota espontánea presente en el mismo. Otras propiedades interesantes que han sido ensayadas son: la capacidad acidificante, la tolerancia a la sal, la capacidad para producir enzimas capaces de degradar las pectinas, la celulosa o el ácido poligalacturónico, la velocidad de crecimiento o la capacidad aminobiogénica.

Para el estudio de la capacidad de implantación, la técnica elegida fue la RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA), que como indicábamos en la Introducción general de esta memoria, ha sido utilizada con éxito para monitorizar fermentaciones cárnicas (Veyrat et al., 1999) y de vegetales como la col (Plengvidhya et al., 1994), y además había sido utilizada en estudios anteriores en nuestro laboratorio, lo que facilitaba su puesta a punto.

El objetivo de este estudio es pues la caracterización tecnológica de las cepas de *Lactobacillus* que habían sido aisladas de una fermentación espontánea de Berenjenas de Almagro para el diseño de un cultivo iniciador capaz de dirigir la fermentación de Berenjenas cuando se utilizaban frutos congelados.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Cultivos y condiciones de cultivo

Se caracterizaron 23 cepas del género *Lactobacillus* obtenidas de las salmueras de una fermentación espontánea de Berenjenas de Almagro, cuya identificación había sido realizada en nuestro laboratorio por Sánchez et al. (2000). 3 de ellas pertenecían a la especie *L. brevis*, 11 a *L. plantarum*, 5 a *L. pentosus* y 4 a *L. fermentum*.

Los cultivos, conservados a -80 °C en caldo MRS con un 20% de glicerol, fueron resembrados en ese mismo caldo e incubados a 37 °C durante 24 h, tras lo cual fueron cultivados en agar MRS (37 °C/48 h) para la comprobación de su pureza.

3.2.2. Caracterización tecnológica

3.2.2.1. Producción de aminas biógenas

Antes de realizar los ensayos y al objeto de inducir la producción de los correspondientes enzimas, las cepas fueron subcultivadas 6 veces, a intervalos de 48 h, en caldo MRS al que se añadía un 0,1% (p/v) del aminoácido a ensayar (L -tirosina (Sigma), L -histidina (Sigma), L -ornitina monohidrócloruro (Merck) o L -lisina monohidrócloruro (Merck)), y un 0,005% del cofactor piridoxal-5-fosfato (Sigma) (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).

La actividad amino-descarboxilasa de las cepas, fue ensayada utilizando el método cualitativo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). En este se realiza una siembra por estría de la cepa en estudio, en un medio con la siguiente composición: 0,5% (p/v) de triptona; 0,5% de extracto de levadura; 0,5% extracto de carne; 0,25% NaCl; 0,05% de glucosa; 0,1% de Tween 80; 0,02% de MgSO_4 ; 0,005% de MnSO_4 ; 0,004% de FeSO_4 ; 0,2% de citrato amónico; 0,001% de tiamina; 0,2% de K_2HPO_4 ; 0,01% de CaCO_3 ; 0,005% de piridoxal-5-fosfato; 0,006% de púrpura de bromocresol y un 2% de agar. Seguidamente, el pH se ajusta a 5,3 y se añade un 1% (p/v) del aminoácido a ensayar. Las placas se incubaron a 37 °C

durante 48 h y se ensayaron tanto condiciones de cultivo aerobias como anaerobias, utilizando el Anaerobic System “Anaerogen” (Oxoid).

Si tras la incubación, en el medio se producía un viraje del color amarillo a púrpura como consecuencia del aumento de pH producido por la descarboxilación del aminoácido, se consideraba que la prueba era positiva. En el caso de la tirosina, por tratarse de un compuesto insoluble, se consideraba que el ensayo era positivo cuando alrededor de la estria desaparecían los cristales del aminoácido.

En todos los ensayos se sembró una placa control que contenía el mismo medio pero sin el aminoácido. De este modo podíamos conocer si el incremento del pH era debido a la producción de otros metabolitos durante el crecimiento.

3.2.2.2. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Reinheimer y Demkow (1989).

Para el crecimiento de las cepas se utilizaron dos medios de cultivo, leche desnatada en polvo reconstituida al 10% (p/v) (Skimmed Milk Powder, Oxoid) y salmuera estéril con la misma composición que la descrita en el Capítulo 2, pero sin condimentos para evitar interferencias en la determinación calorimétrica. A ésta se le añadía un 2% (p/v) de glucosa para favorecer el crecimiento. De esta forma intentábamos simular de la forma más aproximada posible las condiciones reales de crecimiento de las cepas en una fermentación de berenjenas.

Tubos que contenían 10 mL de alguno de estos medios fueron inoculados al 2% (v/v) con cultivos de noche en caldo MRS de las cepas en estudio, por duplicado. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 12 horas y se ensayaron dos formas de incubación en estático y en agitación (100 rpm), para comprobar si la distinta disponibilidad de oxígeno durante el crecimiento afectaba a los resultados, tal y como indican Ocaña et al. (1999).

Tras la incubación a uno de los cultivos se añadía catalasa en exceso (4000 U/mL, Sigma) y se dejaba actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. De esta forma pretendíamos eliminar el H₂O₂ que se hubiera producido, pero quedarían cualesquiera otras sustancias producidas en el crecimiento capaces de

producir interferencias en la determinación posterior. Estos cultivos se utilizaron como control.

Cuando se utilizaba leche desnatada como medio de cultivo, antes de la determinación se añadían a cada tubo 2,5 mL de ácido tricloroacético al 40% para precipitar las proteínas de la leche.

Seguidamente y en todos los casos, las muestras fueron centrifugadas (12000 rpm/10 min a 5 °C) y al sobrenadante se añadían sucesivamente: 0,25 mL de H₂SO₄ 4 N, agitábamos, una gota de (NH₄)₂MoO₄ al 3% (p/v) y 1 mL de KI al 20% (p/v) (recién preparado). Tras agitar, la mezcla se mantenía en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min.

En presencia de agentes oxidantes como el H₂O₂, el KI es oxidado a I₂ y este puede ser determinado espectrofotométricamente a 350 nm. Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DU-530, calculándose la concentración (µg/mL) de peróxido de hidrógeno producido, en la recta de calibrado preparada a tal efecto (0,5-100 µg/mL).

3.2.2.3. Presencia de las actividades pectinásica, celulásica y poligalacturonásica

El ablandamiento ha sido descrito por los consumidores como un defecto sensorial habitual en las Berenjenas de Almagro (Ballesteros, 1996). La presencia de microorganismos productores de pectinasas, celulasas o poligalacturonasas, capaces de degradar los tejidos vegetales, ha sido asociada con el ablandamiento de otros vegetales (Amoa-Awua y Jakobsen, 1995), motivo por el que consideramos interesante determinar la capacidad de producción de estas enzimas en nuestras cepas.

Se utilizó el método propuesto por Amoa-Awua y Jakobsen (1995). Antes de proceder a su determinación, y para inducir la síntesis de estas enzimas, las cepas fueron subcultivadas 5 veces en intervalos de 48 h en caldo MRS modificado que contenía un 0,2% de glucosa, y 0,1% (p/v) de alguno de los siguientes sustratos: pectina (Sigma), carboximetilcelulosa (Panreac) o ácido poligalacturónico (Sigma).

A continuación, las cepas se sembraban por estría en placas de agar MRS modificado que contenía de carboximetilcelulosa (5 g/L), o ácido poligalacturónico (10 g/L) o pectina (10 g/L). Tras incubar 5 días a 37 °C las placas que contenían carboximetilcelulosa y ácido poligalacturónico se teñían con una solución de rojo congo al 0,1% (p/v), observándose en el caso de cepas productoras de los correspondientes enzimas, la aparición de zonas no teñidas alrededor de la estría. En el caso de las placas con pectinas, el ensayo se consideraba positivo si alrededor de la estría aparecían pequeños precipitados del sustrato. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, utilizándose como control positivo un cultivo de *Bacillus cereus* 148^T, proporcionado por la CECT.

3.2.2.4. Cálculo de la velocidad de crecimiento

Las cepas se inocularon al 10% en caldo MRS por triplicado y fueron incubadas a 37 °C en condiciones aerobias hasta que los cultivos alcanzaban la fase estacionaria. El crecimiento fue determinado por medida de la densidad óptica (D.O.) a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-530. La velocidad específica de crecimiento fue calculada mediante la ecuación:

$$\mu = d (\ln DO_{660}) / dt$$

3.2.2.5. Actividad acidificante

Se utilizó el método propuesto por Gatti et al. (1999). Las cepas fueron cultivadas durante 24 h en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. La capacidad acidificante fue calculada como el Δ pH ocurrido durante el cultivo, para lo que se efectuó una medida inmediatamente después de la inoculación y otra tras 24 h de incubación. Se utilizó un pHmetro Crison mod. Basic 20.

3.2.2.6. Tolerancia a la sal

Se siguió el procedimiento descrito en el Capítulo 1 de esta memoria. Se utilizó caldo MRS que contenía 40, 65 y 80 g/L de NaCl. Las dos primeras son

concentraciones frecuentemente utilizadas en la industria de encurtidos y la tercera es la descrita por Montaña et al. (1992) como la concentración límite que permite el crecimiento de las bacterias lácticas, sin un retraso excesivo.

3.2.2.7. Estudio de la capacidad bacteriocinogénica

La capacidad para producir bacteriocinas es una propiedad de gran interés en las cepas que vayan a formar parte de un cultivo iniciador, por la ventaja que la misma puede suponer para su implantación en el proceso.

Este fue un amplio estudio en el que se ensayaron algunos de los métodos citados con mayor frecuencia en la bibliografía consultada. Se utilizaron tanto cultivos, como sobrenadantes libres de células, con y sin concentrar.

Se realizó un primer “screening” utilizando el método del “spot test” descrito por Fleming et al. (1975) con ligeras modificaciones. Sobre una placa de agar MRS modificado que contenía un 0,2% de glucosa, se disponían 5 µL (una gota) de un cultivo de noche en caldo MRS de la cepa en estudio. La placa se incubaba a 37 °C durante 24h en anaerobiosis para evitar la formación de H₂O₂, y tras la incubación se cubría con 5 mL de un agar blando (0,7%) adecuado para el crecimiento del microorganismo indicador que se fuera a utilizar inoculado con 100 µL de un cultivo de noche del mismo (ver Tabla 3.1). La placa se incubaba otras 24 h en las condiciones óptimas para el crecimiento del indicador y si tras la incubación se observaba un halo de inhibición del crecimiento alrededor de la gota, el ensayo se consideraba positivo.

La Tabla 3.1 muestra las cepas utilizadas como indicadores y las condiciones de cultivo utilizadas en cada caso. Todas ellas fueron proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

TABLA 3.1. Microorganismos indicadores y condiciones de cultivo utilizadas

(*)	CEPA	Medio de Cultivo	Tª de incubación (°C)
1	<i>Serratia marcescens</i> 846 ^{T(**)}	TSB	26
2	<i>Citrobacter freundii</i> 401 ^T	TSB	37
3	<i>Yersinia enterocolitica</i> 500	TSB	37
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 143 ^T	TSB	37
5	<i>Proteus vulgaris</i> 484 ^T	TSB	37
6	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> 875 ^T	MRS ^(***)	30
7	<i>Salmonella choleraesuis</i> 443	TSB	37
8	<i>Bacillus cereus</i> 148 ^T	TSB	30
9	<i>Enterococcus faecalis</i> 184	BHI	37
10	<i>Streptococcus thermophilus</i> 986 ^T	BHI	38
11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 912 ^T	MRS	30
12	<i>Pediococcus damnosus</i> 793 ^T	MRS	26
13	<i>Escherichia coli</i> 45	TSB	37
14	<i>Staphylococcus aureus</i> 86	TSB	37
15	<i>Enterobacter aerogenes</i> 684 ^T	TSB	30
16	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 562 ^T	MRS	30
17	<i>Lactobacillus collinoides</i> 922 ^T	MRS	26
18	<i>Lactobacillus brevis</i> 4121 ^T	MRS	30
19	<i>Lactobacillus pentosus</i> 4023 ^T	MRS	30
20	<i>Lactobacillus fermentum</i> 285	MRS	37
21	<i>Aerococcus viridans</i> 978 ^T	TSB	30
22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 219 ^T	MRS	26
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 220	MRS	37
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> 748 ^T	MRS	37
25	<i>Lactobacillus brevis</i> 216	MRS	28
26	<i>Lactobacillus fermentum</i> 4007 ^T	MRS	37
27	<i>Lactococcus lactis</i> 185 ^T	MRS	30
28	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 4695 ^T	MRS	37

(*) Números asignados a los cultivos indicadores; (**) T = cepa tipo; (***) MRS modificado con 0,2% de glucosa para el spot test

Los aislados que mostraron actividad frente a alguno de los indicadores fueron ensayados de nuevo empleando el método del “agar well diffusion” (Cintas et al., 1995), utilizando como indicadores *Lactococcus lactis* 185^T y *Pediococcus pentosaceus* 4695^T. Se seleccionaron estas cepas porque en el ensayo del “spot test” habían resultado muy “sensibles” a la actividad antimicrobiana.

En este método que utiliza el sobrenadante libre de células, el aislado a ensayar se cultivaba en caldo MRS hasta alcanzar la fase estacionaria y seguidamente el cultivo se centrifugaba a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C. Al objeto de evitar posibles interferencias (inhibición del crecimiento del indicador), por la presencia en el sobrenadante de ácidos orgánicos o de peróxido de hidrógeno producidos en el crecimiento, antes del ensayo se ajustaba su pH a un valor de 6,2 con NaOH 1M y se le añadían 4000 U/mL de catalasa (Sigma). Finalmente este sobrenadante era filtrado a través de filtros de 0,22 μm de baja retención de proteínas (Durapore®, Millipore).

Para obtener sobrenadantes concentrados se ensayaron tres métodos la liofilización utilizando un liofilizador FTS Systems, la evaporación en un rotavapor (Büchi Rotavapor R-200) y la diálisis con tripas de diálisis (Thomas Scientific) frente a tampón fosfato (5 mM, pH 6,5) durante 36 h a 4 °C.

Para ensayar los sobrenadantes obtenidos (concentrados y sin concentrar) se prepararon placas con 20 mL de MRS con un 0,7% de agar, adecuado para el crecimiento del indicador que se vaya a utilizar (Tabla 3.1), a los que se añadía un volumen adecuado del cultivo del indicador para alcanzar recuentos de 10^6 ufc. Tras solidificar, se realizaban pocillos de 6 mm de diámetro con un sacabocados estéril, se sellaban con unas gotas de agar blando para evitar pérdidas y se llenaban con 50 μL del sobrenadante a ensayar. Para favorecer la difusión del sobrenadante, las placas se mantenían en el refrigerador (≤ 8 °C) durante 2 h y a continuación se incubaban en las condiciones óptimas para el crecimiento del indicador. Tras 24 h de incubación se medía el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de los pocillos.

Asimismo, y para conocer en qué etapa del crecimiento celular se producían las bacteriocinas, se realizó un ensayo en el que se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo de un cultivo (25 mL) de la cepa en estudio en caldo MRS, preparándose los sobrenadantes como se ha descrito anteriormente.

El último de los métodos ensayados fue el propuesto por Yang et al. (1992). Estos autores indican que las bacteriocinas quedan en ocasiones adsorbidas a la pared celular de las células que las producen, siendo necesario proceder a su desorción utilizando pHs ácidos, antes de la preparación de los sobrenadantes

libres de células. Se prepararon cultivos de noche en caldo MRS que se centrifugaron ($12000 \times g/15$ min). Las células recogidas fueron lavadas con tampón fosfato sódico (5 mM, pH 6,5) estéril y seguidamente resuspendidas en un volumen (1/5 del inicial) de solución estéril de NaCl 100 mM, pH 2, ajustada con ácido fosfórico al 5%, permaneciendo en agitación durante 1 h a 4 °C. Tras una nueva centrifugación, los sobrenadantes fueron concentrados mediante diálisis durante 24 h a 4 °C y finalmente liofilizados. Diferentes diluciones del concentrado obtenido, se ensayaron en pocillos como se ha explicado anteriormente en el "agar well diffusion".

3.2.3. Ensayos de fermentación

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio y se utilizaron berenjenas que, tras haber sido acondicionadas y escaldadas como se describe en el Capítulo 1 fueron colocadas en bandejas de fondo perforado en una sola capa, e introducidas en un congelador convencional a -20 °C, donde se mantuvieron 3 meses.

Se utilizaron los mismos fermentadores y una salmuera de la misma composición que la descrita en el Capítulo 2. La preparación de los inóculos y el procedimiento de inoculación fueron los descritos en ese Capítulo. Los fermentadores se mantuvieron a 30 ± 2 °C durante 8 días, y al término de la fermentación las Berenjenas fueron envasadas en las instalaciones de una industria colaboradora, con el líquido de gobierno que utilizan en la misma.

Para el seguimiento del proceso se tomaron diariamente muestras de salmuera, tal y como se describe en el Capítulo 1, en las que se realizaron los correspondientes análisis químicos y microbiológicos.

3.2.4. Análisis químico y microbiológico de las salmueras

El tratamiento previo de las salmueras y los análisis químicos efectuados fueron igualmente los descritos en el Capítulo 1, pero en esta ocasión se determinó la concentración de cloruro sódico utilizando un clorurómetro Chloride Analyser Sherwood (mod. 926) (Sherwood Scientific Ltd. Cambrigde, UK).

El análisis microbiológico consistió en recuentos de bacterias lácticas en agar MRS tras incubar a 37 °C durante 48 h, en condiciones anaerobias.

Todos los análisis se realizaron por duplicado.

3.2.5. Seguimiento de los cultivos inoculados

Se utilizó la técnica conocida como Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR), cuyo fundamento ha sido descrito en la Introducción general de esta memoria.

La Figura 3.1 muestra de forma esquemática las principales etapas del método de obtención de los patrones de polimorfismo de ADN mediante RAPD y su tratamiento posterior.

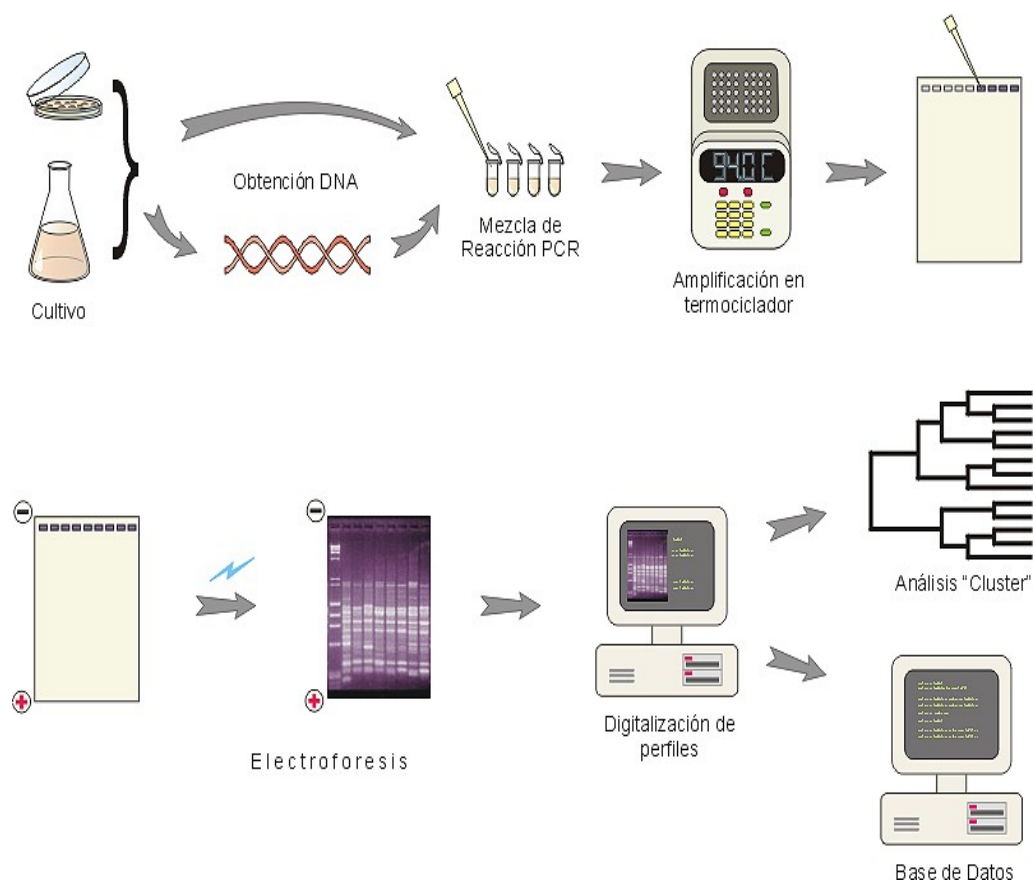


FIGURA 3.1. Principales etapas de la aplicación de la técnica RAPD-PCR

De las placas de agar MRS utilizadas en los recuentos de cada fermentador se tomaron 10 colonias que fueron analizadas mediante RAPD-PCR.

3.2.5.1. Preparación de los extractos crudos de ADN

La técnica RAPD puede ser aplicada a ADN purificado o bien a ADN obtenido directamente de un cultivo (líquido o sólido), lo que resulta mucho más rápido y sencillo. Diversos autores (Welsh y McClellan, 1991; Mazurier et al., 1992; Veyrat et al., 1999) han descrito que los resultados obtenidos con ambos procedimientos son muy similares.

En nuestro estudio para la extracción del ADN, se ensayaron 3 métodos con varios aislados elegidos al azar: 2 kits comerciales, “Bactools” (Biotools) y MasterPure™ (Ecogen), y el método de extracción rápida de Veyrat et al. (1999), con las modificaciones propuestas por Sánchez et al. (2004).

En este último, partíamos de una colonia bien desarrollada (diámetro de 1-2 mm) que se resuspendía con la ayuda de una punta de pipeta estéril, en 50 µL de tampón 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), que contenía 5 U de mutanolisina, incubándose a 37 °C durante 2 h. Tras este pretratamiento enzimático que debilita las paredes celulares, la suspensión celular se centrifugaba ($13600 \times g/15 \text{ min}/4 \text{ °C}$) y el sedimento celular obtenido se lavaba con tampón 10 mM Tris-HCl (pH 9,0). Finalmente se resuspendía en 50 µL de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1% Tritón X-100) y se introducía en un baño con agua a ebullición durante 5 minutos, para la lisis celular.

Cuando se utilizaron los kits comerciales se siguieron los procedimientos descritos por los fabricantes.

3.2.5.2. Amplificación del ADN

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400).

Las cantidades de los componentes de la mezcla de reacción de PCR y el programa de amplificación fueron optimizados y las condiciones finalmente utilizadas son las que se detallan en las Tablas 3.2 y 3.3. Se utilizó el cebador de

secuencia arbitraria OPL-05 (5'-ACGCAGGCAC-3') porque había sido utilizado con buenos resultados anteriormente (Sánchez et al., 2004). El volumen final de reacción fue de 50 μ L

TABLA 3.2. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componentes	Concentración del stock	Cantidad por reacción ($V_{\text{final}}=50 \mu\text{L}$)	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción (Biotools)	10×	5 μL	1×
4 dNTPs mix (Biotools)	25 mM (cada nucleótido)	4 μL	2 mM (cada nucleótido)
MgCl ₂	50 mM	2 μL	2 mM
Cebador OPL-05 (Genotek)	25 μM	2 μL	1 μM
ADN polimerasa (Biotools)*	1 U/ μL	1 μL	1 U
H ₂ O	-	31 μL	-
ADN molde	-	5 μL	-

* Añadir tras el primer ciclo

TABLA 3.3. Programa de amplificación utilizado en la reacción de PCR

Nº de ciclos	Fase de desnaturalización	Fase de hibridación	Fase de extensión
1	5 min a 95 °C		
2	40 s a 94 °C	1 min a 45 °C	1 min a 72 °C
30	40 s a 94 °C	1 min a 52 °C	3 min a 72 °C
1			5 min a 70 °C

En todos los ensayos se incluyó una muestra-control negativa que no contenía ADN, para asegurarnos del buen funcionamiento de la técnica y comprobar si se producían amplificaciones inespecíficas.

Al término de la reacción los tubos con los amplificadores se mantenían a 5 °C hasta que se realizaba la electroforesis.

3.2.5.3. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación

La separación y visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Los geles se prepararon con agarosa tipo D-1 Baja-EEO (Pronadisa, Alcobendas, Madrid) al 1,5% (p/v) en tampón TBE 1× [54 g/L Tris(hidroximetil)aminometano; 27,5 g/L ácido bórico; 20 mL EDTA 0,5 M, pH 8] y contenían 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Bio-Rad).

Las muestras (20 µL del amplificado con 4 µL de tampón de carga 6× [0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 30% v/v glicerol]) eran cargadas en el gel y seguidamente éste se sumergía en tampón TBE 1× en la cubeta de electroforesis (Bio-Rad). La electroforesis se realizó a una intensidad constante de 70 A durante 2 horas. Los geles se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (UV) (Vilber Lourmat) a 254 nm, y sus imágenes fueron recogidas con un sistema captador de imágenes digital (DC 290 Zoom, KODAK).

Para la normalización posterior de los geles, en cada uno de los extremos, se cargaban 2 µL del marcador de peso molecular 100 bp-ladder (Biotools), mezclados con 15 µL de tampón de carga 6×. Este marcador tiene 11 fragmentos de ADN, de tamaños comprendidos entre 80 y 1031 pb.

3.2.5.4. Estudio de reproducibilidad y análisis numérico de los perfiles de polimorfismo de ADN

En este tipo de ensayos es siempre necesario llevar a cabo un estudio de reproducibilidad de la técnica. Para ello se tomaron al azar 4 aislados con los que por cuadruplicado se llevó a cabo el procedimiento completo de obtención de los perfiles RAPDs como se ha descrito anteriormente. De cada uno de los aislados se prepararon 4 cultivos en placas de agar MRS, de los que se obtuvieron los correspondientes extractos crudos de ADN que se amplificaron, resultando un total de 4 reacciones para cada aislado. Los productos de amplificación de los replicados

fueron separados 2 a 2 en geles diferentes, para estimar también la reproducibilidad entre geles. El análisis numérico de los 16 patrones de amplificación obtenidos se realizó como se describe a continuación.

Para la conversión, normalización y procesamiento de las imágenes, se utilizó el programa informático GelCompar versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) (Vauterin y Vauterin, 1992). La comparación de los perfiles de polimorfismo de ADN se realizó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y se realizó un análisis cluster mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Average Linkage) que permitió la construcción de los correspondientes dendrogramas de similitud. El valor de "r" (coeficiente de correlación de Pearson) se expresó en el dendrograma como % de similitud ($r \times 100$).

Los pasos seguidos para el análisis de los perfiles fueron los siguientes:

- Registro de los perfiles electroforéticos como imágenes tipo "tiff"
- Normalización por estandarización de la longitud de los perfiles, con compensación de las pequeñas diferencias para un mismo gel y entre geles y eliminación del ruido de fondo
- Medida de la similitud de los perfiles mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (r) (Sneath y Sokal, 1973)
- Análisis cluster mediante el cálculo del algoritmo a partir de la matriz de los valores r (Sokal y Michener, 1958)
- Cálculo del coeficiente de correlación Cofenética, que mide la distorsión del dendrograma obtenido a partir de la matriz de datos de similitud (Sokal y Rohlf, 1962).

3.2.6. Análisis sensorial

Tres meses después del envasado, las Berenjenas fermentadas en este estudio y otras 2 de marcas comerciales fueron evaluadas sensorialmente. Se realizó un análisis sensorial descriptivo en el que participó un panel de 10 catadores entrenados. Los atributos analizados y la ficha de cata utilizada fueron

los seleccionados en el Capítulo 1. Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado en sesiones diferentes.

3.2.7. Análisis estadístico de los resultados

A los resultados del análisis sensorial, se les aplicó el test de Student-Newman-Keuls, con un nivel de significación $\alpha \leq 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS para Windows (versión 10.0) (SPSS, 2000).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización tecnológica de las cepas

La Tabla 3.4 recoge los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización tecnológica de las cepas.

¡Error! Vínculo no válido.

Sólo 7 de las 23 cepas estudiadas fueron capaces de descarboxilar alguno de los aminoácidos ensayados, en particular la ornitina, no influyendo en los resultados las condiciones de incubación (aerobiosis o anaerobiosis). La Figura 3.2 muestra el viraje del color amarillo a púrpura producido cuando el ensayo era positivo.



FIGURA 3.2. Placas mostrando un resultado positivo (izquierda) y negativo (derecha) en el ensayo de producción de aminas biógenas

Por especies se observa que, mientras todas las cepas de *L. brevis* fueron capaces de descarboxilar alguno de los aminoácidos ensayados, ninguna de las *L. plantarum* lo hicieron, a excepción de la cepa 4G2₃ que descarboxiló la ornitina. Las cepas de *L. pentosus* mostraron un comportamiento muy similar a aquellas de *L. plantarum* y únicamente se observó un débil cambio de color en las placas de lisina sembradas con la cepa 7G3₆. La capacidad de los aislados de *L. fermentum* para descarboxilar la ornitina, fue dependiente de la cepa. Ninguna de las 23 cepas ensayadas produjo histamina.

TABLA 3.4. Resultados de la caracterización tecnológica^a

^a Símbolos: (+) positivo, (-) negativo. Los valores mostrados son la media \pm la desviación estándar.
^b Valores obtenidos con cultivos en agitación.
^c ND= no detectada (≤ 5 IU/ml).
^d Capacidad acidificante medida como Δ pH tras 24 h de incubación.
^e Velocidad específica de crecimiento $\mu = d(\ln OD_{600})/dt$.

Estos resultados confirman la limitada capacidad de las bacterias lácticas aisladas de vegetales para producir aminos biógenas, como ya había sido apuntado por Daeschel et al. (1987). Asimismo confirman lo indicado por Beutling (1996) y Bover-Cid et al. (2001), quienes afirman que la capacidad de éstas para producir aminos biógenas es una propiedad dependiente de la cepa más que de la especie en sí misma. A pesar de esto, es posible afirmar que la capacidad aminobiogénica parece ser mucho más frecuente en cepas de algunas especies como *L. brevis* que en las de otras como *L. plantarum* que, generalmente, han sido descritas como no productoras de estas aminos (Silla Santos, 1998; Bover-Cid et al., 2001).

Podemos concluir que cualquiera de las cepas de *L. plantarum* o de *L. pentosus*, serían candidatas “seguras” a ser utilizadas en un cultivo iniciador, por su incapacidad para producir aminos biógenas.

Todas las cepas crecieron con concentraciones de NaCl de 40 y 65 g/L, aunque aquellas de *L. fermentum* lo hicieron muy débilmente a la mayor de estas concentraciones. Con una concentración de 80 g/L, sólo crecieron las cepas de *L. plantarum* y *L. pentosus*, que también en esta ocasión mostraron un comportamiento muy similar. Hugas et al. (1993) obtuvieron resultados idénticos con cepas de estas especies procedentes de embutidos.

Con respecto a los ensayos de producción de H_2O_2 , es interesante indicar que en los primeros análisis efectuados encontramos que, en todos los casos, se producían pequeñas cantidades de yodo molecular (I_2) tras la reacción colorimétrica. Este hecho fue lo que nos llevó a pensar que tal vez durante la incubación, las cepas producían otros compuestos oxidantes diferentes del peróxido de hidrógeno que interferían en los resultados, y por ello introdujimos un control que se trataba tal y como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos.

Los resultados de los ensayos posteriores recogidos en la Tabla 3.4, muestran que la capacidad para producir peróxido de hidrógeno es inherente a la cepa, coincidiendo con lo descrito por Yap y Gilliland, (2000). Las cantidades producidas variaban con las condiciones de incubación y con el medio de cultivo utilizado, produciéndose siempre mayores cantidades cuando se incubaba en agitación y con leche semidesnatada, si bien la capacidad para producir H_2O_2 era

independiente de las condiciones. Resultados similares han sido obtenidos en estudios realizados por otros autores (Ocaña et al., 1999).

Tres de las cuatro cepas de *L. fermentum* y una de *L. plantarum* produjeron peróxido de hidrógeno, siendo la cepa 6G1₄ de *L. fermentum* la que destacó de forma más sobresaliente. La capacidad acidificante varió también con las cepas (Tabla 3.4), con descensos de pH que oscilaron entre 1,81 y 2,42 unidades. Las cepas de *L. fermentum* mostraron en esta ocasión un comportamiento más homogéneo, siendo además las menos acidificantes como corresponde a su naturaleza heterofermentativa. Por el contrario, las cepas de *L. plantarum*, con la excepción de las cepas 5G2₂, y 7G2₄ fueron las más acidificantes.

Las velocidades específicas de crecimiento oscilaron entre 0,37 y 0,69 h⁻¹. Beal et al. (1994) en un ensayo utilizando idénticas condiciones de cultivo, obtuvieron valores similares a los de este estudio para la especie *L. plantarum*.

Ninguna de las 23 cepas estudiadas mostró actividad pectinásica, celulásica o poligalacturonásica.

De los resultados hasta ahora expuestos merece ser destacado el comportamiento tan similar, de las cepas de *L. pentosus* y *L. plantarum*, en muchas de las propiedades tecnológicas ensayadas, lo que era quizás esperable en especies filogenéticamente tan relacionadas y con fenotipos tan similares (Torriani et al., 2001).

La Tabla 3.5 muestra los resultados del estudio de la capacidad bacteriocinogénica.

Los tamaños de los halos de inhibición fueron en ocasiones superiores a los 10 mm (Figura 3.3). Los indicadores pertenecientes al grupo de las BL, resultaron más sensibles a su actividad, destacando las especies *Lc. lactis* 185^T y *P. pentosaceus* 4695^T. Coincidiendo con lo publicado por Garriga et al. (1993), pudo observarse que también en lo que se refiere a la sensibilidad como indicador, el comportamiento de las cepas fue diferente, encontrándonos con que las cepas de una misma especie no eran igualmente inhibidas.

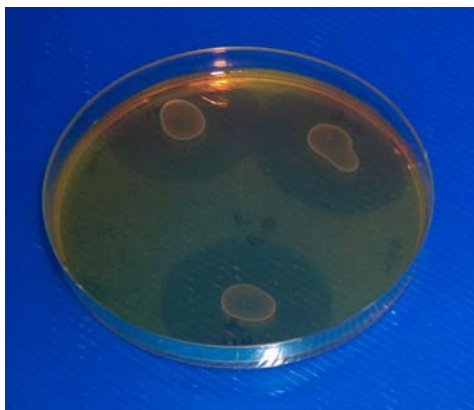


FIGURA 3.3. Placa mostrando algunos resultados obtenidos en el "agar spot test"

¡Error! Vínculo no válido.

Los sobrenadantes libres de células concentrados y sin concentrar de las 20 cepas que habían mostrado alguna actividad en el "agar spot test", fueron ensayados con el método "agar well diffusion" y en esta ocasión no se produjo la inhibición del crecimiento de alguno de los dos indicadores en ningún caso. Otros autores (Garriga et al., 1993) han indicado que cuando se pasa de ensayar cultivos en medio sólido (agar spot test) a ensayar los sobrenadantes libres de células neutralizados (agar well diffusion) disminuye considerablemente el porcentaje de cepas con actividad antagonista.

Tampoco se obtuvieron resultados positivos cuando se analizaron los sobrenadantes de las muestras tomadas en distintos momentos de la curva de crecimiento. Con este ensayo pretendíamos conocer no sólo en qué momento de la curva de crecimiento se producían las bacteriocinas sino también si los resultados negativos de los ensayos anteriores podían ser debidos a la degradación de éstas tras su excreción al medio, ya que con anterioridad se habían ensayado sobrenadantes tomados al inicio de la fase estacionaria de crecimiento (Casaus, 1998).

Los sobrenadantes obtenidos tras el tratamiento de desorción (Yang et al., 1992) tampoco mostraron actividad inhibidora del crecimiento.

El análisis de estos resultados nos lleva a sugerir que la ausencia de actividad bacteriocinogénica en los sobrenadantes podía ser debida a diversas razones (i) que la actividad inhibidora del crecimiento detectada en medio sólido, fuera debida a otros factores como el pH del medio o la producción de peróxido de hidrógeno. No obstante, esto es bastante improbable porque se establecieron estrategias para evitar estos falsos positivos, como la utilización de un medio con baja concentración de azúcar que evitaba una excesiva producción de ácidos, y la adición de catalasa que eliminaba el posible peróxido de hidrógeno formado, (ii) que las cepas ensayadas únicamente fueran capaces de producir y/o liberar bacteriocinas cuando se desarrollaban en medio sólido, (iii) que las posibles bacteriocinas producidas no fuesen activas al pH al que se ajustaba el sobrenadante, lo que no parece probable por los datos recogidos en la bibliografía para otras bacteriocinas y iv) que las cepas estudiadas no tuvieran capacidad bacteriocinogénica. Algunos de estos aspectos han sido también apuntados por Casaus (1998).

Los resultados de este estudio nos permiten afirmar que tan sólo cuando se ensayaron cultivos enteros de las cepas (agar spot test) pudo detectarse actividad inhibidora del crecimiento, si bien no se pudo confirmar que ésta fuera debida a la producción de bacteriocinas. De todas las cepas ensayadas la que mostró un mayor espectro de inhibición fue la 3G3₃ de *L. plantarum* que en los ensayos anteriores, había demostrado tener una elevada capacidad acidificante, aunque no producía peróxido de hidrógeno.

La primera conclusión que se desprende de estos resultados es que, como ya han indicado algunos autores (Ramos y Harlander, 1990; Mora et al., 2000; Bover-Cid et al., 2001), existen diferencias importantes entre las cepas de una misma especie, de ahí que sea necesaria una caracterización previa de las mismas antes de su selección para formar parte de un cultivo iniciador.

3.3.2. Ensayos de fermentación

3.3.2.1. Diseño de los cultivos iniciadores

Para el diseño de los cultivos iniciadores se consideró conveniente elegir una cepa de cada una de las especies identificadas por Sánchez et al. (2000) en la fermentación de la Berenjena de Almagro. No obstante, por la similitud de comportamiento observada en el estudio de caracterización tecnológica entre las cepas de *L. pentosus* y las de *L. plantarum* y basándonos en el hecho de que *L. plantarum* había sido la especie más abundante en esa fermentación, se optó por seleccionar sólo una cepa de esta especie. Se eligieron por tanto las 3 cepas que habían mostrado las mejores propiedades en el estudio de caracterización tecnológica.

La cepa 6G1₄ de *L. fermentum* fue seleccionada por ser la mayor productora de peróxido de hidrógeno. De la especie *L. plantarum* se eligió la 3G3₃, que había mostrado una capacidad acidificante ligeramente superior a las restantes de esta especie, un mayor espectro de inhibición en el estudio de la actividad bacteriocinogénica y además había sido el genotipo de *L. plantarum* más abundante en la fermentación de donde procedían estos aislados (Sánchez et al., 2004). La cepa 3G2₂ de *L. brevis*, fue elegida al azar porque todas las de esta especie tuvieron un comportamiento muy similar. Su capacidad para descarboxilar la ornitina no fue considerada un impedimento serio para su elección porque había sido aislada de un proceso espontáneo y por el bajo contenido en proteínas de las berenjenas, hace bastante improbable que se pueda alcanzar una concentración de putrescina peligrosa para el consumidor (Stratton et al., 1991).

Antes de ser definitivamente seleccionadas como cultivos iniciadores se llevó a cabo un ensayo cruzado utilizando el método del spot test, para determinar que no había ningún tipo de inhibición entre ellas, que resultó negativo.

Con las cepas seleccionadas se prepararon 3 lotes:

- **Lote A** (fermentadores I y II) se inocularon con la cepa 3G3₃ de *L. plantarum*. El motivo de que se considerara esta opción fue que los cultivos iniciadores comerciales para vegetales están compuestos habitualmente sólo por esta especie, y siempre resulta tecnológicamente más sencillo la utilización de cultivos monoespecie.

- **Lote B** (fermentadores III y IV) se inocularon con una mezcla a partes iguales de las cepas 3G3₃ de *L. plantarum* y 6G1₄ de *L. fermentum*.
- **Lote C** (fermentadores V y VI) se inocularon con una mezcla a partes iguales de las 3 cepas seleccionadas, la 3G3₃, la 6G1₄ y la 3G2₂ de *L. brevis*.

3.3.2.2. Evolución de las fermentaciones y seguimiento de los cultivos inoculados

La evolución de los parámetros químicos en las salmueras de fermentación (datos no mostrados) fue la habitual en este proceso y muy similar a la mostrada en la Figura 2.1 (Capítulo 2).

También los recuentos de BL siguieron una evolución similar a la descrita en el capítulo anterior, y mientras que los fermentadores inoculados alcanzaron recuentos de 10^8 ufc/mL (Figura 3.4) pocas horas después de la inoculación, en los no inoculados estos valores se alcanzaron 4 días más tarde manteniéndose hasta el final de la fermentación.

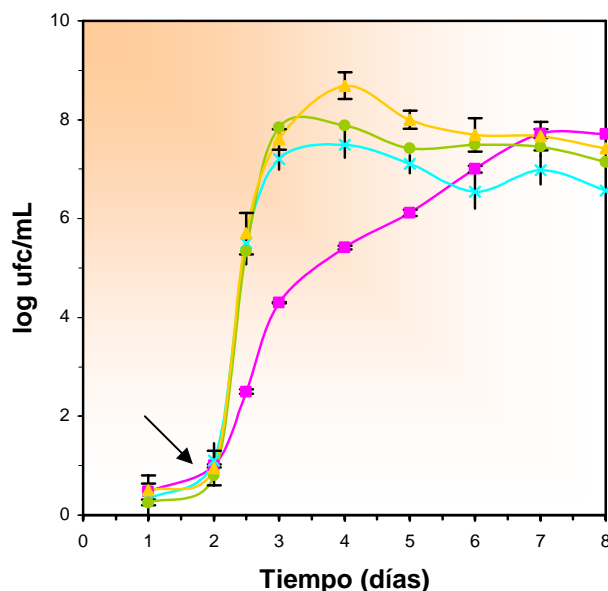


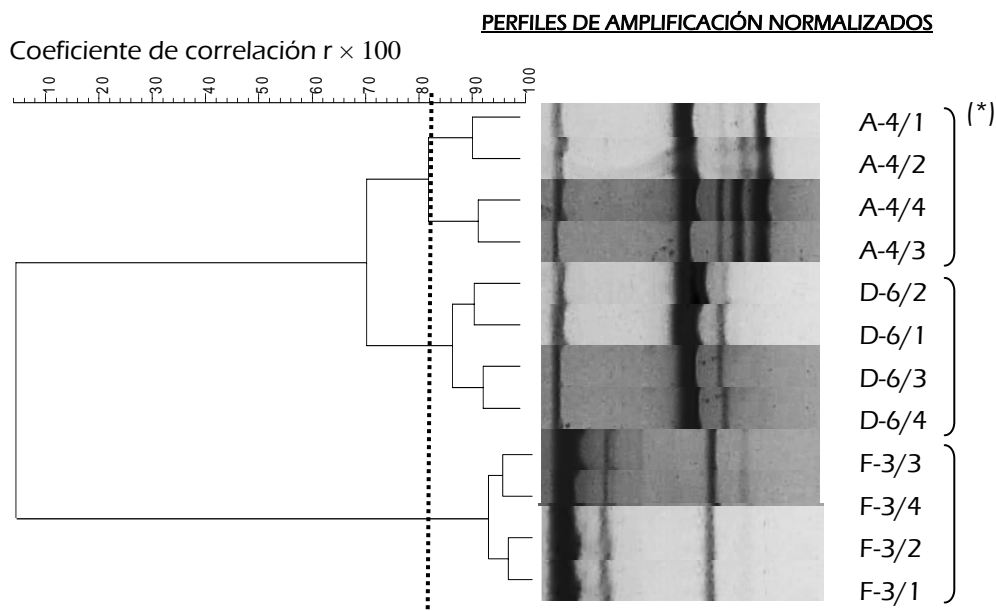
FIGURA 3.4. Evolución de los recuentos de bacterias lácticas durante la fermentación.

✕ Lote A; ● Lote B; ▲ Lote C; ■ Fermentadores no inoculados; Inoculación

De las placas utilizadas en los recuentos se obtuvieron un total de 582 aislados, que fueron analizados mediante RAPD.

Con los 3 métodos de extracción del ADN ensayados, obtuvimos resultados equivalentes por lo que optamos por el método de extracción rápida descrito por Veyrat et al. (1999) por su simplicidad, bajo coste y rapidez metodológica. Esta técnica permitió la lisis de todos los aislados lo que facilitó enormemente el ensayo ya que la extracción se hacía directamente de las colonias tomadas de las placas de los recuentos, sin purificación previa.

La Figura 3.5 muestra el dendrograma de similitud obtenido en el estudio de reproducibilidad.



valor de similitud= 81%

(*) 1 y 2 corresponden a los perfiles RAPDs obtenidos en uno de los geles y 3 y 4 a los del otro gel

Figura 3.5. Perfiles de amplificación y dendrograma de similitud obtenidos en el estudio de reproducibilidad

La línea discontinua indica el mínimo valor de similitud ($r \times 100$), igual al 81%, obtenido en este estudio. Este valor fija el umbral por encima del cual dos aislados pueden ser considerados clones idénticos de la misma cepa, y ha sido utilizado en este estudio para asignar los aislados obtenidos de las salmueras de los fermentadores a alguna de las cepas inoculadas como cultivos iniciadores.

La Figura 3.6 muestra un gel con los perfiles de polimorfismo (RAPDs) de ADN de las tres cepas utilizadas como cultivos iniciadores y de otros aislados obtenidos de las salmueras..

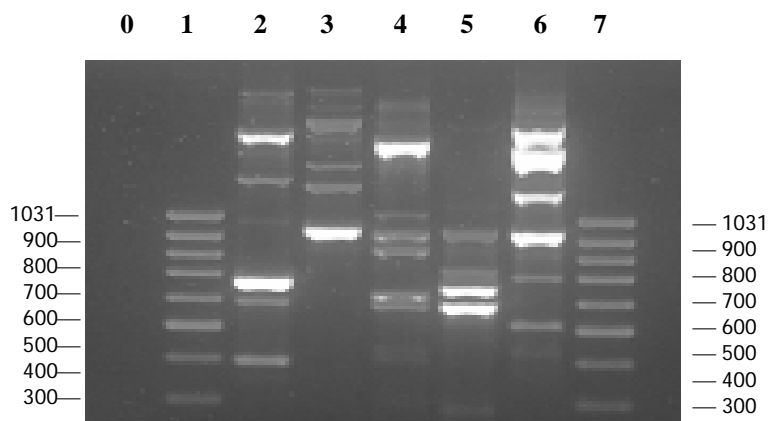


FIGURA 3.6. Perfiles de polimorfismo RAPDs de las cepas inoculadas y de algunos aislados procedentes de las fermentaciones. Línea 2: *L. plantarum* 3G3₃; Línea 3: *L. fermentum* 6G1₄; Línea 4: *L. brevis* 3G2₂; Líneas 5 y 6: aislados no identificados. Líneas 1 y 7: marcador de pesos moleculares (100 bp Ladder; Biotools); Línea 0: control negativo.

Las notables diferencias entre ellos permitían una fácil y rápida diferenciación visual, a pesar de lo cual, se realizó el análisis numérico de los perfiles

de polimorfismo RAPDs de todos los aislados, asignándose a alguna de las cepas inoculadas cuando sus perfiles se agrupaban en el mismo cluster con un $r \geq 81\%$. En caso contrario fueron considerados aislados de “identidad desconocida”.

En la Figura 3.7 se muestran a modo de ejemplo algunos geles obtenidos en este estudio.

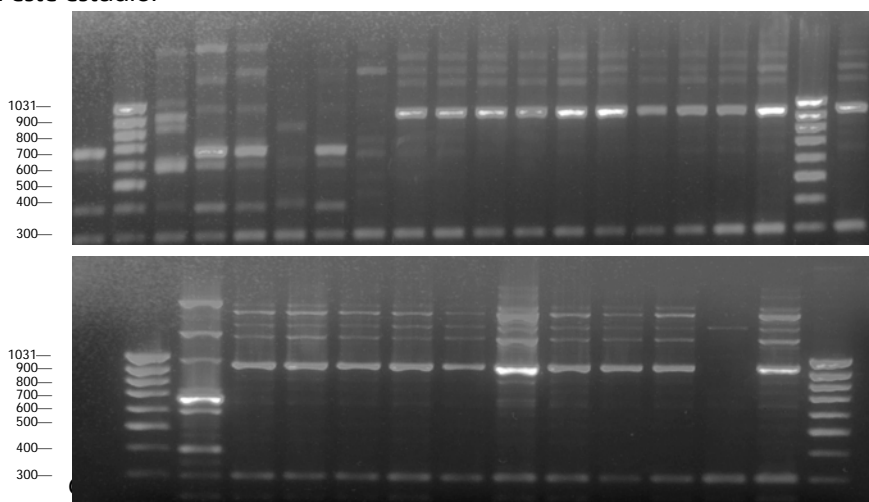


FIGURA 3.7. Geles de agarosa con los perfiles RAPDs de algunos aislados obtenidos con el cebador OPL-05. Durante los dos días anteriores a la inoculación, fueron diferentes de los de las cepas inoculadas y algunos de ellos volvieron a aparecer en otros días de fermentación.

Un hecho observado con cierta frecuencia en los patrones de amplificación de los aislados obtenidos de las salmueras de los últimos días de fermentación, fue la desaparición de alguna de sus bandas (Figura 3.8).

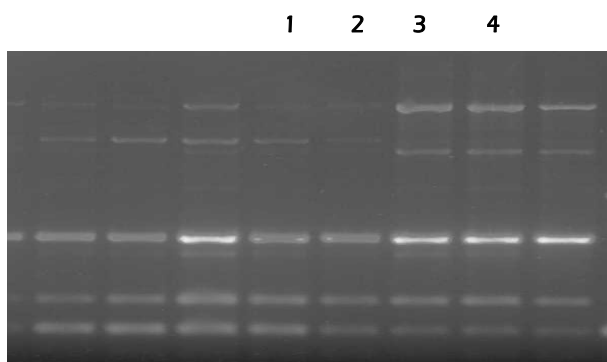


FIGURA 3.8. Patrones de amplificación RAPDs de aislados de los últimos días de fermentación (Líneas 1 y 2) y de los primeros días (Líneas 3 y 4)

Este hecho, atribuible a un proceso de adaptación de las cepas hizo difícil su asignación que se realizó considerando únicamente las bandas restantes como describen otros autores (Hayford et al., 1999).

No obstante es necesario indicar que esta simplificación es posible sólo cuando, y como ocurre en este estudio, se trata de fermentaciones muy controladas, con escasa presencia de otra microbiota acompañante, pero nos lleva a pensar en las dificultades que podrían surgir cuando se tratase de monitorizar cepas inoculadas en fermentaciones industriales, donde la presencia de cepas salvajes de las mismas especies está casi garantizada.

Una vez asignados los perfiles pudo calcularse la implantación de las cepas inoculadas en cada uno de los días de la fermentación. Esta se expresó como el cociente entre el número de aislados pertenecientes a cada una de las cepas y el número total de aislados obtenidos ese día, y por 100.

La Figura 3.9 muestra los resultados del estudio de implantación. Los valores representados son la media de los obtenidos para cada lote.

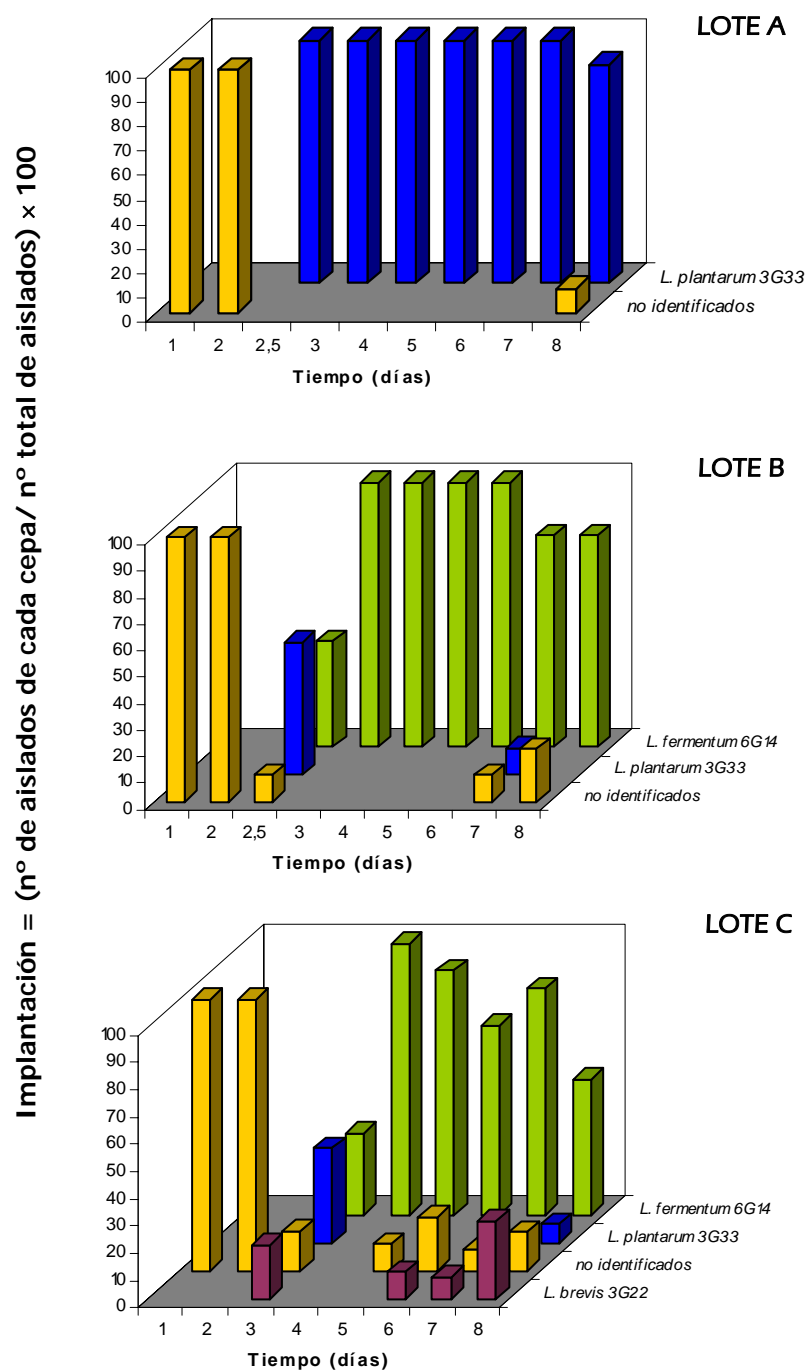


FIGURA 3.9. Porcentajes de implantación de los cultivos iniciadores

Tras la inoculación (día 2 de la fermentación), se observa, en todos los lotes, un claro predominio de las cepas inoculadas, no alcanzándose en ningún caso valores superiores al 20% para los aislados “no identificados”. En el lote A, donde la única cepa inoculada había sido *L. plantarum* 3G3₃, se observa un predominio casi absoluto de la misma desde el momento de la inoculación. En los lotes B y C en los que se inocularon mezclas a partes iguales de distintos cultivos, se observa que, aunque inmediatamente tras la inoculación la presencia de las distintas cepas era la esperada, pocas horas más tarde hay un claro predominio de la cepa 6G1₄ de *L. fermentum*, en detrimento de las restantes, cuya presencia fue escasa o en algunos momentos, nula. *L. brevis* 3G2₂ aunque estuvo presente hasta el final de la fermentación, su porcentaje de participación fue siempre inferior al 30%.

De los resultados del estudio de implantación, merece ser destacada la dificultad mostrada por *L. plantarum* para colonizar el proceso, cuando se inoculaba en cultivos mixtos. Este hecho resulta muy sorprendente si se tiene en consideración que las 3 cepas utilizadas en este estudio habían sido aisladas de una fermentación espontánea en la que Sánchez et al. (2000) describieron que *L. plantarum* había sido la especie predominante durante toda la fermentación.

Estos resultados contradicen lo afirmado en el Capítulo anterior, en el que atendiendo a los resultados del análisis sensorial, “suponíamos” la “no implantación” de la cepa de *L. fermentum* utilizada es ese proceso, y confirman la conveniencia de utilizar algún método con gran capacidad discriminante, como es la RAPD-PCR para la monitorización de las cepas inoculadas. Además, es posible afirmar que la RAPD-PCR, a pesar de la escasa reproducibilidad sugerida por algunos autores (Bassam et al., 1992; Cusick y O’Sullivan, 2000), resultó ser un método eficaz para realizar el seguimiento de las cepas inoculadas, en este tipo de fermentaciones.

3.3.4. Análisis Sensorial

En la Figura 3.10 se ha representado en un diagrama de “tela de araña” el perfil sensorial de las berenjenas evaluadas, obtenido de los resultados del análisis sensorial descriptivo.

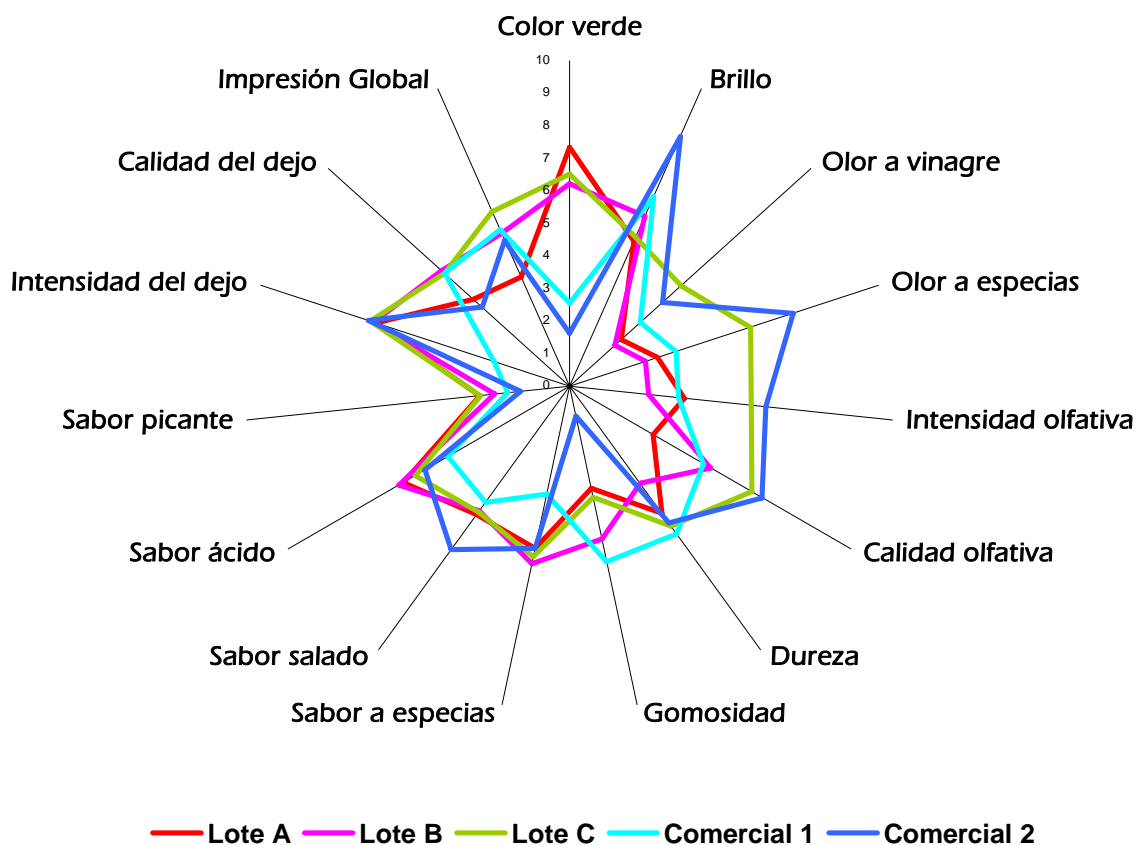


FIGURA 3.10. Representación de las puntuaciones medias obtenidas para cada atributo en el análisis sensorial descriptivo

Cuando se aplicó el test de Student-Newman-Keuls, a las puntuaciones otorgadas por los catadores resultó que sólo existían diferencias significativas para los atributos intensidad olfativa y color verde.

Estos resultados confirmaron aquellos obtenidos en el estudio del efecto de la congelación (Capítulo 1), en el que las Berenjenas elaboradas con frutos congelados no fueron sensorialmente hablando “peores” que las elaboradas con frutos no congelados.

Las Berenjenas del lote C obtuvieron una puntuación ligeramente superior en el atributo “impresión global”, lo que nos permitiría concluir que el mejor cultivo

iniciador sería aquel constituido por una mezcla de cepas de las especies, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. fermentum* a pesar de que los estudios de monitorización han mostrado una escasa implantación de la cepa de *L. plantarum*. En nuestra opinión, no debería prescindirse de esta especie en ningún caso porque sus excelentes propiedades tecnológicas hacen que su contribución, aunque escasa, sea importante en el proceso.

Del análisis de estos resultados y teniendo en consideración que las diferencias observadas entre las Berenjenas de los lotes B y C, fueron realmente pequeñas, proponemos como cultivo iniciador más adecuado para la fermentación de las Berenjenas de Almagro, aquel constituido por las cepas 3G3₃ de *L. plantarum* y 6G1₄ de *L. fermentum*.

La adición de una tercera cepa de *L. brevis* complica la preparación de los inóculos y las diferencias observadas no son en modo alguno notables.

3.4. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden de los resultados anteriormente expuestos son:

- ✓ Las propiedades tecnológicas tienen carácter intraespecífico, por lo que es necesario realizar una caracterización de las cepas antes de su inclusión en un cultivo iniciador.
- ✓ El cultivo iniciador más adecuado debería incluir una mezcla de especies homo y heterofermentadoras, siendo la cepa *L. fermentum* 6G1₄ una excelente candidata, por su buena implantación en la fermentación de las Berenjenas de Almagro.
- ✓ Las cepas inoculadas aunque de forma desigual lograron implantarse en el proceso, lo que hace pensar que podrían resultar de gran utilidad en la industria para desestacionalizar la elaboración de las Berenjenas de Almagro. No obstante este punto debería ser confirmado a escala industrial.
- ✓ La RAPD resultó ser una técnica de gran utilidad en la monitorización de cultivos inoculados, si bien es necesario que las condiciones experimentales se definan con gran precisión para que la reproducibilidad sea la adecuada.

Capítulo 4

A decorative graphic on the right side of the page. It features a series of horizontal lines of varying lengths, some solid and some dashed, extending from the left towards the right. Below these lines, there are three overlapping circles of different shades of blue. The top circle is a medium blue, the middle one is a darker blue, and the bottom one is a light blue. The circles are positioned in a way that they appear to be stacked or overlapping each other.

**Estudio de la capacidad de
implantación a escala
industrial de cultivos
iniciadores seleccionados para
la elaboración de Berenjenas
de Almagro**

4.1. INTRODUCCIÓN

El estudio que se describe en este Capítulo, es parte de un proyecto de investigación subvencionado por la Consejería de Industria y Trabajo de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha que se planteó a solicitud de una empresa del sector, en la búsqueda de soluciones a los problemas que la misma tenía en la elaboración de Berenjenas de Almagro. Esta empresa había tenido en repetidas ocasiones fallos en la fermentación o paradas fermentativas que producían un reblandecimiento importante de los frutos, lo que les impedía su comercialización, ocasionándoles importantes pérdidas económicas.

Para conocer el origen del problema planteamos un estudio del proceso de elaboración que llevan a cabo en la empresa (resultados recogidos en el capítulo siguiente) y en paralelo realizamos un ensayo para conocer el comportamiento de las cepas que habíamos seleccionado previamente y la viabilidad de su utilización a escala industrial, como una posible solución a los problemas de paradas fermentativas. Este estudio permitiría al mismo tiempo, confirmar la idoneidad de los cultivos iniciadores previamente en el laboratorio y completar el proceso de selección.

En este punto es necesario indicar, como ya lo han hecho algunos otros autores (Etchells et al., 1973; Daeschel y Fleming, 1984) que la utilización de cultivos iniciadores a escala industrial exige ciertas condiciones de “higiene”, en utensilios e instalaciones, para evitar competencias entre los microorganismos inoculados y aquellos de la flora natural, condiciones con las que no contábamos en este estudio, y que iban a requerir un esfuerzo económico importante para la empresa, en caso de que la utilización de cultivos iniciadores fuera una solución viable a sus problemas.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Cultivos utilizados

Las cepas utilizadas en este estudio, *L. plantarum* 3G3₃, *L. fermentum* 6G1₄ y *L. brevis* 3G2₂, habían sido caracterizadas previamente en nuestro laboratorio y seleccionadas por sus mejores propiedades tecnológicas. Antes de su utilización, fueron cultivadas en medio MRS con una concentración de NaCl del 3% (p/v) idéntica a la de la salmuera que se utiliza en la empresa. De esta tratábamos de que se adaptaran a estas concentraciones y evitar el que no crecieran más tarde en los fermentadores.

4.2.2. Diseño experimental

Este estudio se realizó en el mes de septiembre de la campaña del año 2004, en las instalaciones de una empresa elaboradora acogida a la IGP “Berenjena de Almagro”.

Se utilizaron berenjenas (*Solanum melongena* L. var. *esculentum depressum*) de un tamaño medio (entre 34 y 44 g), recién recolectadas, que fueron acondicionadas y tratadas de la forma habitual en esta empresa.

Se utilizaron barriles de 30 L de capacidad (Figura 4.1), similares a los que utilizan habitualmente en esta fábrica pero de menor volumen, que contenían 10 Kg de berenjenas. El procedimiento de llenado y la adición de salmuera, así como la composición de la misma y las condiciones de fermentación fueron idénticos a las de las fermentaciones industriales.

Los inóculos se añadieron en una concentración aproximada de 10^5 ufc/mL de cada cepa y se prepararon resuspendiendo una cantidad adecuada de cada uno de los liófilos, en una alícuota de la propia salmuera, tal y como se ha descrito en el Capítulo 2.

Se ensayaron 2 cultivos iniciadores. Uno de ellos estaba formado por las cepas 3G3₃ de *L. plantarum* y 6G1₄ de *L. fermentum* a partes iguales y el otro por una mezcla de las cepas 3G3₃ y 3G2₂ de *L. brevis* también a partes iguales.

La adición de los inóculos se realizó durante el llenado de los barriles. Los cultivos se inocularon por duplicado y se prepararon además otros dos fermentadores que se dejaron fermentar espontáneamente y se usaron como control.

Los barriles se situaron en una nave cubierta de 50 x 15 metros sin control alguno de temperatura, por lo que las oscilaciones fueron las propias de la época del año en la que se realizó el estudio y junto a los industriales, para considerar el posible efecto de intercambio de la microbiota.

Para el seguimiento de la fermentación se tomaron muestras diarias de las salmueras, donde se realizaron los correspondientes análisis físico-químicos y microbiológicos.



FIGURA 4.1. Barriles utilizados en las fermentaciones

Una vez concluida la fermentación las berenjenas fueron envasadas en botes de 1 Kg, utilizando el líquido de gobierno habitual en la empresa y los botes se cerraron y se pasteurizaron en sus instalaciones.

4.2.2. Evolución de la fermentación

Los análisis químicos efectuados fueron los mismos que se han descrito en los capítulos anteriores. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Los análisis microbiológicos consistieron en:

- ✓ Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales mediante siembras en profundidad en placas de agar Plate Count (PCA) (Scharlau) (APHA, 1976) incubándose a 30 °C durante 72 h.
- ✓ Recuentos de bacterias lácticas en placas de agar MRS que se incubaron a 30 °C durante 48 h, en anaerobiosis.
- ✓ Recuento de enterobacterias en placas de agar rojo violeta glucosa bilis (VRBG, Oxoid) que se incubaron a 37 °C durante 72 h (Mossel et al., 1962).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución de las fermentaciones fue similar en todos los casos (Figura 4.2), incluidos los fermentadores no inoculados.

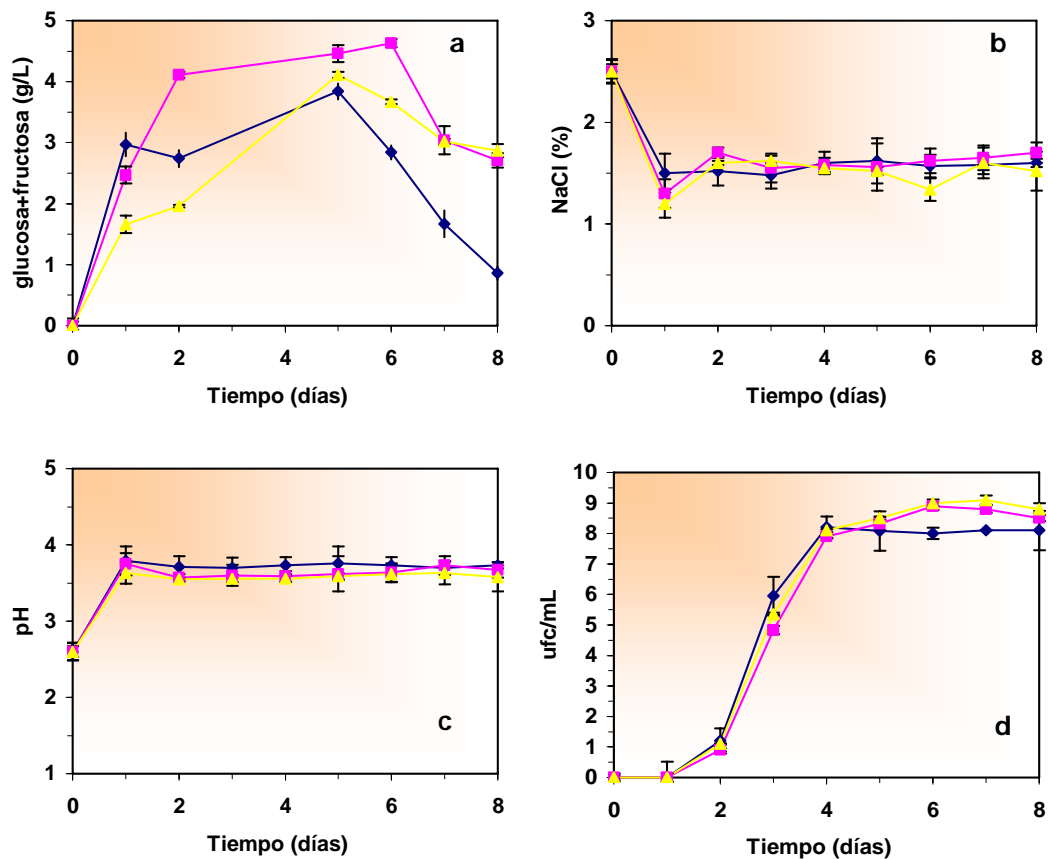


FIGURA 4.2. Evolución de la fermentación. ■ *L. plantarum* 3G3₃ y *L. fermentum* 6G1₄; ◆ *L. plantarum* 3G3₃ y *L. brevis* 3G2₂; ▲ Fermentadores sin inocular **a:** Concentración de Glucosa + Fructosa, **b:** Concentración de NaCl, **c:** pH, **d:** Recuentos de aerobios mesófilos totales

A partir del día 5-6 del proceso se observó un descenso de la concentración de azúcares (Glucosa+Fructosa) (Figura 4.2 a), que nos indicaba el inicio de la fermentación. En ese mismo punto, los recuentos de mic

roorganismos totales, que habían seguido la evolución habitual, alcanzaban sus valores máximos, en torno a las 10^8 ufc/mL (Figura 4.2 d). Los

recuentos en las placas de agar MRS (datos no representados) fueron muy bajos en todos los casos y las escasas colonias que crecieron no presentaban el aspecto propio de aquellas correspondientes a bacterias lácticas. Eran de gran tamaño y color rosado (Figura 4.3) y su observación microscópica en fresco reveló que se trataba de levaduras.



FIGURA 4.3. Levaduras crecidas en agar MRS

En las placas de agar VRBG no hubo crecimiento alguno, lo que confirmaba la ausencia de enterobacterias en el proceso.

Un hecho destacable es que la concentración de NaCl (Figura 4.2 b) en la salmuera (25 g/L) es ya inicialmente algo más baja que la utilizada en otras empresas, lo que unido al descenso que ocurre en las primeras horas del proceso, hizo que ésta alcanzara valores en torno a los 15 g/L casi desde el inicio de la fermentación, lo que sin duda favoreció la proliferación de levaduras en la salmuera.

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de ácido láctico (datos no mostrados), lo que nos indicaba que no estaba ocurriendo una fermentación láctica y que los cultivos que habíamos inoculado no se habían implantando en el proceso. Estos resultados confirmaban aquellos de los recuentos en las placas de agar MRS y permitían afirmar que las levaduras, procedentes muy probablemente de los frutos, eran los únicos microorganismos presentes en las salmueras durante la fermentación, y por tanto responsables de la desaparición de los azúcares de la misma.

Estos resultados del todo sorprendentes, nos hicieron pensar en la posibilidad de que algún ingrediente de la salmuera estuviera inhibiendo el crecimiento de las bacterias lácticas que en tan elevada proporción habían sido inoculadas.

Cuando preguntamos al personal de la empresa la composición de la salmuera, nos indicaron que para evitar el oscurecimiento de las berenjenas utilizan un compuesto antioxidante que es un potente bactericida. La presencia de este compuesto en la salmuera inhibiría el crecimiento de la microbiota láctica presente en los frutos, lo que a su vez provocaría un crecimiento masivo de levaduras, que serían las responsables de los problemas de reblandecimiento que el personal de la empresa manifestó al inicio del proyecto.

La ausencia de bacterias lácticas produce además un enlentecimiento de la fermentación, y como puede observarse en la Figura 4.2 a, el último día del proceso quedaba una cantidad importante de azúcares residuales en la salmuera. Esto supone un riesgo de contaminación microbiana, que podría afectar a la estabilidad y a las características organolépticas de las Berenjenas.

Los malos resultados obtenidos en este estudio, no permiten extraer conclusión alguna o afirmar que las cepas seleccionadas no serán capaces de implantarse en un proceso cuando se utilicen a escala industrial, siendo necesaria la realización de estudios adicionales.

Este estudio, por el contrario, si ha puesto de manifiesto que el proceso de elaboración de Berenjenas de Almagro, incluso entre empresas acogidas a la IGP, es diferente. Este hecho fue el motivo de que nos planteáramos la realización de un estudio comparativo de la microbiota láctica que participa en la elaboración de las Berenjenas de Almagro en distintas empresas elaboradoras, cuyos resultados se recogen en el capítulo siguiente.

Capítulo 5

A decorative graphic on the right side of the page. It features a series of horizontal lines of varying lengths and colors (purple, blue, and light blue) extending from the left towards the right. On the right side, there are three overlapping circles of different shades of blue and purple, arranged in a vertical stack.

**Estudio de la diversidad
genética de la microbiota
láctica que participa en la
fermentación de
Berenjenas de Almagro
en distintas empresas
elaboradoras y en distintas
campañas**

5.1. INTRODUCCIÓN

El proceso tecnológico de elaboración de Berenjenas de Almagro en las empresas acogidas a la IGP, ha sido descrito en detalle en la Introducción general de esta memoria. Sin embargo, es necesario indicar que, aunque en esencia éste es muy similar en las diferentes empresas, se producen variaciones que pueden afectar sustancialmente al proceso y, en definitiva, a las características del producto obtenido.

En un estudio de tipificación de la Berenjena de Almagro realizado por Ballesteros (1996), se encontraron diferencias significativas en algunas características físicas (textura), químicas y sensoriales en las Berenjenas de Almagro comercializadas, lo que a criterio de este autor resulta del todo inaceptable para el consumidor especialmente cuando, como ocurre en este caso, se trata de un producto acogido a una IGP. Ballesteros en ese trabajo indicaba que el origen de estas diferencias podría ser la participación de una microbiota diferente en la fermentación lo que ha sido confirmado, al menos en parte, en el estudio descrito en el capítulo anterior.

Los estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio para conocer la microbiota participante en la fermentación espontánea de la Berenjena de Almagro (Sánchez et al., 2000, 2003, 2004), se habían llevado a cabo utilizando muestras de salmuera tomadas de una de las principales industrias elaboradoras, pero no teníamos conocimiento alguno de lo que ocurría en otras empresas acogidas a esta IGP.

Planteamos entonces un estudio con un doble objetivo i) conocer la diversidad genética de la microbiota láctica presente en la salmuera de fermentación de otras dos industrias elaboradoras, para compararla con aquella descrita por Sánchez et al. (2000) y ii) conocer la variabilidad en la composición de la microbiota láctica entre campañas, para lo cual, se tomaron muestras de la misma empresa en la que lo habían hecho Sánchez et al. (2000). De este forma pretendíamos conocer si, al igual que ocurre en otras fermentaciones de alimentos (Marcellino et al., 2001; Sánchez et al., 2005), existe una población de

BL endémica en la empresa y si existen genotipos “cosmopolitas”, es decir extendidos a otras empresas.

Para conocer la diversidad genética de la población bacteriana presente en un ecosistema es necesario recurrir a métodos con un elevado poder discriminante (Berthier y Ehrlich, 1998; Fitzsimons et al., 1999; Blaiotta et al., 2001) y que a su vez sean rápidos y adecuados para el manejo de un gran número de aislados. En los últimos años, los métodos basados en la reacción de PCR han sido los más utilizados, y así por ejemplo, la RAPD-PCR ha sido utilizada con éxito, en estudios dirigidos a conocer los cambios ocurridos en las poblaciones microbianas que participan en la fermentación espontánea de algunos alimentos (Charteris et al., 1997; Gardiner et al., 1998; Fitzsimons et al., 2001; Giraffa et al., 2004).

Al abordar este estudio somos conscientes de las limitaciones que tiene el utilizar un método dependiente de cultivo como es la RAPD-PCR cuando lo que se pretende es conocer la diversidad microbiana de un ecosistema natural lo que requiere, en opinión de algunos autores (Brock, 1987; Gray y Head, 2001; Giraffa y Neviani, 2000; Giraffa, 2004), la utilización de metodologías independientes de cultivo como la DGGE, la TGGE o la FISH. A pesar de esto, creemos que son indudables los beneficios que se pueden obtener de un mejor conocimiento, aunque sea parcial, de la microbiota participante en estas fermentaciones.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Toma de muestras

Las muestras de salmuera fueron recogidas en tres empresas elaboradoras de Berenjenas de Almagro acogidas a la IGP, localizadas en diferentes poblaciones de la provincia de Ciudad Real (España).

En todas ellas se utiliza el procedimiento tradicional de elaboración. Los frutos una vez acondicionados, calibrados y escaldados, son colocados en bidones de plástico de aproximadamente 250 Kg de capacidad (Figura 5.1), se cubren con una salmuera cuya composición es propia y secreta, y se dejan fermentar espontáneamente.



FIGURA 5.1. Barriles de fermentación utilizados en la industria

Los bidones se sitúan en recintos cubiertos, donde no se ejerce control alguno de la temperatura. La duración del proceso varía con la empresa y está en gran parte supeditada a las necesidades de producción. Para el control del proceso, únicamente se realiza un seguimiento diario del pH de la salmuera.

Al objeto de uniformizar en la medida de lo posible los procesos, las muestras fueron tomadas simultáneamente en todas las empresas y se procuró que en todos casos las berenjenas fueran de un tamaño intermedio (30-40 g). La toma de muestras se realizó como se ha descrito en el Capítulo 2 de esta memoria, en las mejores condiciones de asepsia, en tubos de plástico estériles

de 10 mL de capacidad, evitando tomar de la capa superior, en ciertos momentos cubierta por un espeso velo, producido por el crecimiento de levaduras oxidativas. Los tubos se llenaban en su totalidad para evitar espacios de cabeza donde se dieran condiciones de aerobiosis, y eran mantenidos en refrigeración hasta su análisis. En todas las ocasiones, se tomaron 2 muestras, una para el análisis microbiológico y otra para el químico.

5.2.2. Análisis de las salmueras

5.2.2.1. Análisis químico

El tratamiento previo de las muestras y los análisis efectuados fueron los descritos en el apartado de Material y Métodos del Capítulo 1, si bien la determinación de la concentración de NaCl se realizó con un clorurómetro Chloride Analyser Sherwood (mod. 926) (Sherwood Scientific Ltd. Cambrigde, UK).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

5.2.2.2. Análisis microbiológico

Las muestras de salmuera fueron diluidas en solución salina (0,9%, p/v NaCl) estéril antes de las correspondientes siembras en placas.

Se efectuaron recuentos de BL en placas de agar MRS, de microorganismos aerobios mesófilos totales en agar Plate Count y de enterobacterias en placas de agar rojo violeta glucosa bilis, como se describe en el Capítulo 4.

5.2.3. Obtención de aislados de bacterias lácticas

De las placas de agar MRS utilizadas en los recuentos, se tomaron al azar un número de aislados (10% del recuento), intentando no obstante tomar representantes de cada una de las morfologías coloniales observadas. Estos aislados se sembraron en agar MRS hasta su purificación.

Los cultivos puros fueron sometidos a dos pruebas preliminares de identificación, la prueba de la catalasa (Norris et al., 1981) y la tinción Gram

(Bartholomew, 1962) para descartar aquellos que no pertenecían al grupo de las BL.

Cultivos en caldo MRS de los aislados de BL fueron conservados en criotubos a -80 °C con un 20% (v/v) de glicerol, como crioprotector.

5.2.4. Caracterización genotípica (genotipado)

Se utilizó la técnica RAPD-PCR. Para la extracción del ADN, se siguió el procedimiento descrito en el Capítulo 3.

Con 5 aislados elegidos al azar se ensayaron los 6 cebadores, cuyas secuencias se recogen en la Tabla 5.1.

TABLA 5.1. Cebadores ensayados y sus secuencias

CEBADOR	SECUENCIA
JOH	5'-TAATCACTGT-3'
OPL-05	5'-ACGCAGGCAC-3'
AMI-1	5'-CCGACTCCA-3'
ARG	5'-CGGCCCTGT-3'
Lp-1	5'-ACGCGCCCT-3'
OPA-4	5'-TGGTCACTGT-3'

Los componentes de las mezclas de reacción y los programas de amplificación fueron optimizados para cada uno de los cebadores. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400).

La electroforesis de los productos de amplificación, el tratamiento de los geles y el análisis numérico de los perfiles de ADN, se llevó a cabo como se describe en el Capítulo 3, utilizándose como marcador de peso molecular el 100 bp-ladder (Biotools) que contiene 11 fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 80 y 1031 pb.

Una vez seleccionados los cebadores se realizó un estudio de reproducibilidad con 3 aislados elegidos al azar y como se describe en ese mismo Capítulo.

5.2.5. Identificación de los aislados de bacterias lácticas

Para la identificación de los aislados, tras el genotipado, se eligieron representantes de cada uno de los genotipos obtenidos y se realizaron pruebas fenotípicas y reacciones de PCR específicas.

a) Pruebas fenotípicas

Para una identificación preliminar se utilizaron las pruebas fenotípicas descritas en el Capítulo 1 (1.2.2.2 apartado c) y se aplicaron los criterios taxonómicos descritos en la bibliografía (Garvie, 1986; Kandler y Weiss, 1986; Holt et al., 1994; Wood y Holzapfel, 1995; Axelsson, 1998), consiguiéndose el agrupamiento de los genotipos.

Para su identificación un 20% de las cepas incluidas en cada grupo fue identificada utilizando tiras API 50CH (Bio-Merieux, l'Etoile, France) y el programa informático APILAB PLUS. Las tiras API se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante.

b) PCRs específicas

La identidad de todos los genotipos fue confirmada mediante PCRs específicas. Se utilizaron los cebadores de la Tabla 5.2 y los componentes de la mezcla de reacción fueron los que se detallan en la Tabla 5.3. La concentración de los cebadores así como las condiciones de amplificación fueron las descritas por los respectivos autores.

Para comprobar la sensibilidad de la reacción de PCR, para cada pareja de cebadores, se ensayaron dos cepas de la especie correspondiente especie y una de una especie próxima filogenéticamente para asegurar así su especificidad.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400).

Tabla 5.2. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR para la identificación de las especies

Especie	Cebador	Secuencia (5' → 3')	T* (°C)	Referencia
<i>L. acidophilus</i>	Aci 16SI	AGCTGAACCAACAGATTCAC	62	Walter et al. (2000)
	16SII	ACTACCAGGGTATCTAATCC		
<i>L. plantarum</i>	16	GCTGGATCACCTCCTTTC	53	Berthier y Ehrlich (1998)
	Lpl	ATGAGGTATTCAACTTATG		
<i>L. brevis</i>	Bre-1	CTTGCACTGATTTTAACA	40	Guarneri et al. (2001)
	Bre-2	GGGCGGTGTGTACAAGGC		
<i>L. pentosus</i>	16	GCTGGATCACCTCCTTTC	53	Berthier y Ehrlich (1998)
	Lpe	GTATTCAACTTATTAGAACG		
<i>L. fermentum</i>	LfPr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	55	Walter et al. (2000)
	FermlI	CTGATCGTAGATCAGTCAAG		
<i>Lc. lactis</i>	Lac	GCTGAAGGTTGGTACTTGTA	59	Aymerich et al. (2003)
	23S	AGTGCCAAGGCATCCACC		
<i>Ln. mesenteroides</i>	LMMf	CCGTTACCCCTAAATT	67	Moschetti et al. (2000)
	LMMr	GACCAAATACAATAGGTTGCG		
<i>L. paracasei</i>	Para	CACCGAGATTCAACATGG	54	Ward y Timmins (1999)
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT		

*Temperatura de anillamiento en la reacción de PCR

En cada reacción se incluía un control positivo que contenía ADN de la cepa tipo de la especie correspondiente (*L. acidophilus* 903^T, *L. plantarum* 748^T, *L. brevis* 4121^T, *L. pentosus* 4023^T, *L. fermentum* 4007^T, *Lc. lactis* subsp. *lactis* 185^T, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 219^T y *L. paracasei* subsp. *paracasei* 4022^T) y dos controles negativos, uno sin ADN y otro con ADN de

una especie diferente a la que se trataba de identificar, lo que permitía detectar amplificaciones inespecíficas. Las cepas fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Tabla 5.3. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componentes	Concentración del stock	Cantidad por reacción ($V_{\text{final}}=25 \mu\text{L}$)	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción (Biotools)	10×	2,5 μL	1×
4 dNTPs mix (Biotools)	25 mM (cada nucleótido)	0,2 μL	200 μM (cada nucleótido)
MgCl ₂	50 mM	0,75 μL	1,5 mM
Cebadores directo e inverso (Genotek)	10 μM (cada cebador)	*	—
ADN polimerasa (Biotools)**	1 U/ μL	0,5 μL	0,5 U
H ₂ O bidestilada estéril	—	***	—
ADN molde	20-100 ng/ μL	2 μL	—

* Se añadió la concentración descrita por los autores

** Añadir tras el primer ciclo

*** Llevar a un volumen final de 25 μL

La separación electroforética de los productos de amplificación se realizó como se ha descrito en el Capítulo 3, excepto en la concentración de agarosa de los geles que en esta ocasión variaba entre el 0,8 y el 1,2%.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el 100-bp ladder (11 fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 80 y 1031 pb) y el Kb ladder (14 fragmentos entre 250 y 10000 pb) (Biotools) que se cargaban en los extremos de cada gel.

5.2.6. Análisis sensorial

Al objeto de relacionar los resultados del estudio de caracterización microbiológica con la calidad sensorial de las Berenjenas de Almagro

elaboradas en cada una de las empresas, se adquirieron muestras comerciales de las 3 empresas estudiadas, y fueron sometidas a una prueba de preferencia con consumidores, como se describe en el Capítulo 1.

5.2.7. Análisis estadístico

Para determinar si la preferencia entre muestras era o no significativa, se aplicó el test de Friedman (O'Mahony, 1986), usando un nivel de significación de $\alpha \leq 0,05$, a los resultados del análisis sensorial.

Asimismo, y para determinar si los valores de pH y los de los recuentos de aerobios mesófilos y de bacterias lácticas obtenidos en este estudio y aquellos obtenidos por Sánchez et al. (2000) eran significativamente diferentes, se aplicó el programa SPSS para Windows (versión 10.0), considerando un nivel de significación de $\alpha \leq 0,05$ para la distribución t de Student.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Estudio de la diversidad genética de la microbiota láctica presente en las salmueras de tres empresas elaboradoras

5.3.1.1. Análisis químico

En la Figura 5.2 se representan los resultados de los análisis químicos efectuados a las salmueras tomadas durante el proceso de elaboración de Berenjenas de Almagro en las tres empresas estudiadas.

El primer aspecto a resaltar es que el tiempo de permanencia de los frutos en la salmuera fue muy diferente en cada caso, con valores que oscilaron entre los 7 días de la empresa A y los 25 de la empresa C. Las concentraciones iniciales de NaCl en las salmueras (Figura 5.2 c) fueron también muy distintas, con valores que oscilaron entre el 1% (p/v) de la empresa B y el 6% (p/v) de la empresa C, observándose una relación entre la concentración de NaCl y la duración de la fermentación. La elevada concentración de NaCl en la empresa C enlentece notablemente la fermentación siendo necesario prolongarla algo más de 20 días para asegurar la desaparición de los azúcares de la salmuera (Figura 5.2 b). Es de destacar el rápido consumo de azúcares (Glucosa + Fructosa) ocurrido en la empresa A (Figura 5.2 d), en la que se observa casi desde el inicio de la fermentación la aparición de ácido láctico y en la que el día 3 los azúcares de la salmuera han desaparecido totalmente pudiendo darse por concluido el proceso.

Otro hecho que merece ser destacado es que en la salmuera de la empresa B no pudo detectarse la presencia de ácido láctico en ningún momento de la fermentación (Figura 5.2 d), lo que nos hizo pensar que el consumo de azúcares estaba siendo producido por microorganismos distintos de las bacterias lácticas. La baja concentración de NaCl utilizada en esta empresa parece permitir el crecimiento de otros microorganismos menos osmotolerantes.

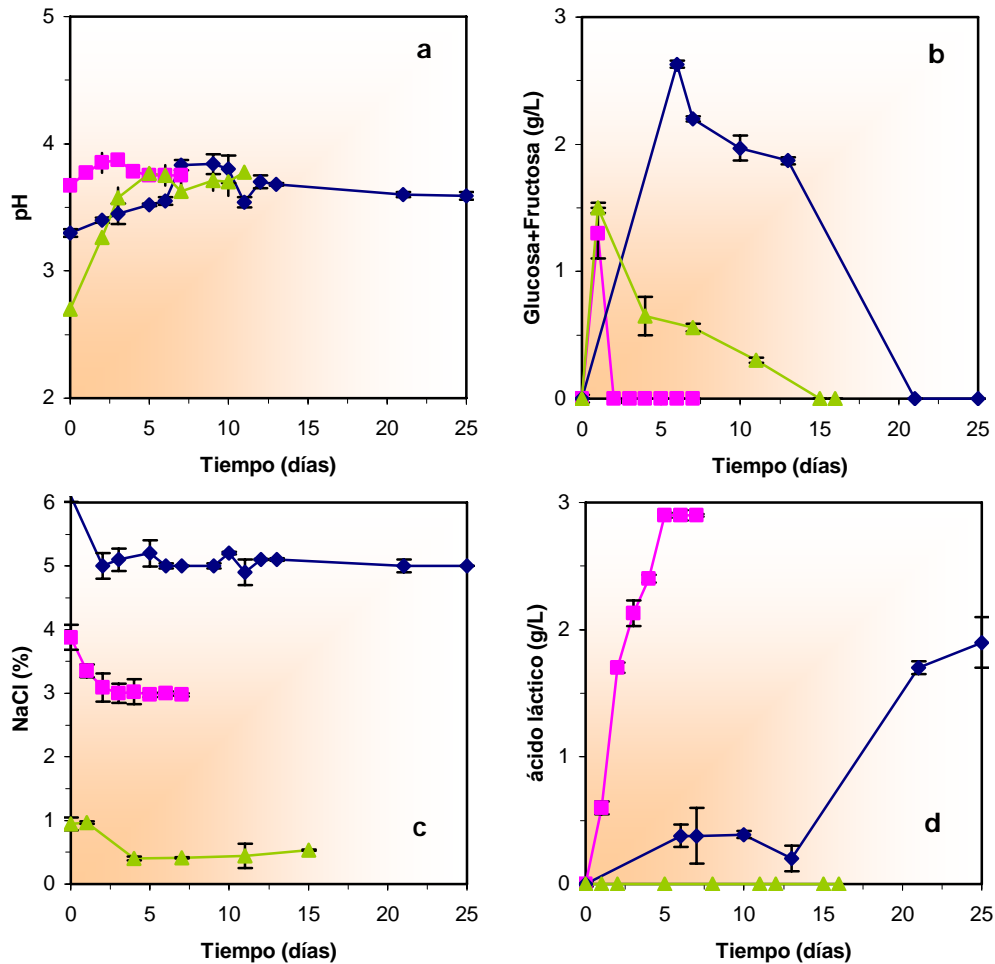


FIGURA 5.2. Evolución de la fermentación. ■ Empresa A ▲ Empresa B ◆ Empresa C
a: pH, **b:** Concentración de glucosa+fructosa, **c:** Concentración de NaCl **d:** Concentración de ácido láctico

Los valores iniciales de pH de las salmueras (Figura 5.2 a) fueron similares, así como la evolución del mismo durante la fermentación, alcanzándose valores entorno a 3,7, al final de la misma. Este valor asegura la estabilidad del producto final, al prevenir el crecimiento de cualquier microbiota indeseable.

Aún con los aspectos anteriormente destacados, puede afirmarse que la evolución durante la fermentación de los parámetros analizados, fue la habitual en este proceso, como ha sido descrito con anterioridad por otros autores (Ballesteros et al., 1999; Sánchez et al., 2000).

A la vista de estos resultados puede concluirse que la concentración de NaCl óptima para que tenga lugar una fermentación láctica en un tiempo lo más corto posible, y con un consumo total de los azúcares, es la de un 4%. Concentraciones superiores hacen el proceso demasiado lento, con el consiguiente problema para la empresa, y concentraciones inferiores tienen el riesgo de permitir el crecimiento de una microbiota inadecuada o indeseable que puede ocasionar problemas de paradas fermentativas, reblandecimiento y cualquier otra alteración del producto, como se ha descrito en el Capítulo anterior.

5.3.1.2. Análisis microbiológico y obtención de aislados de bacterias lácticas

No se detectó la presencia de enterobacterias en ninguna de las muestras analizadas.

En las 3 empresas, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales transcurridas 24 h fueron inferiores a 10^3 ufc/mL, (datos no mostrados) pero en pocas horas se produjo un rápido incremento, alcanzándose recuentos de 10^9 ufc/mL, que se mantuvieron hasta el final. La evolución de estos recuentos fue paralela a la de bacterias lácticas (Figura 5.3), lo que “a priori” nos permitiría afirmar que prácticamente toda la microbiota que crece en las placas de PCA crece también en las placas de MRS.

Los recuentos en las placas de agar MRS (Figura 5.3) fueron similares en las tres empresas y similares a los descritos para otras fermentaciones espontáneas de vegetales (Ruiz Barba et al., 1994; Leal-Sánchez et al., 2003).

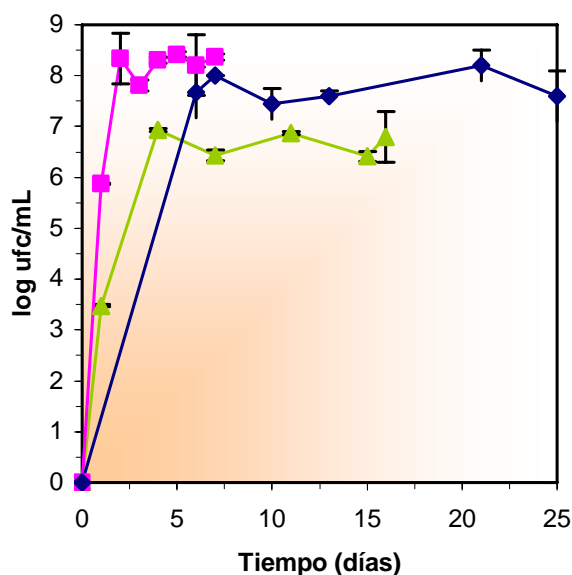


FIGURA 5.3. Evolución de los recuentos en agar MRS. ■ Empresa A ▲ Empresa B ◆ Empresa C

En las placas de agar MRS de la empresa B la mayor parte de las colonias no presentaban el aspecto característico de aquellas correspondientes a bacterias lácticas y su observación microscópica reveló que se trataba de levaduras. Este hecho confirmaba la presencia en estos fermentadores, de una microbiota distinta de la esperada, al igual que había ocurrido en el estudio de implantación, que habíamos realizado simultáneamente, y cuyos resultados se han recogido en el Capítulo 4. Asimismo explicaba la ausencia de ácido láctico en esta salmuera. Este hecho evitó que en esta empresa pudiera tomarse un número de aislados similar al de las otras 2 empresas estudiadas.

De las placas de agar MRS utilizadas en los recuentos se obtuvieron un total de **433** aislados de los que un 73% resultaron ser catalasa (-) y Gram (+) y fueron considerados pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas. De éstos **184** procedían de la empresa A; **24** de la empresa B y **108** de la empresa C.

Un 80% de los aislados restantes resultaron ser levaduras (todas procedentes de las salmueras de la empresa B) y el otro 20% fueron catalasa (+) y/o Gram (-) y fueron por tanto excluidos de este estudio.

Los resultados obtenidos en los ensayos de producción de CO₂ de la glucosa y de NH₃ de la arginina, junto con la morfología celular, permitieron establecer 4 grupos:

- Grupo I: Bacilos CO₂ (-) y NH₃ de la arginina (-)
- Grupo II: Bacilos CO₂ (+) y NH₃ de la arginina (+)
- Grupo III: Cocos CO₂ (+) y NH₃ de la arginina (-)
- Grupo IV: Cocos CO₂ (-) y NH₃ de la arginina (+)

que fueron asignados a los géneros *Lactobacillus* (grupos I y II), *Leuconostoc* (grupo III) y *Lactococcus* (grupo IV).

Según esta asignación y atendiendo a su origen, se podría afirmar que el 100% de los aislados procedentes de las salmueras de las empresas A y C eran *Lactobacillus*, mientras que los de la empresa B pertenecían a los géneros *Lactobacillus* (50%), *Leuconostoc* (25%) y *Lactococcus* (25%).

De estos resultados preliminares cabe destacar el predominio del género *Lactobacillus* en las tres empresas analizadas, y la escasa diversidad de géneros de BL en las salmueras de las empresas A y C. Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos por Sánchez et al. (2000), y con los descritos en el Capítulo 1 de esta memoria.

Una explicación a este hecho sería el bajo pH inicial de las salmueras, que en todos los casos fue inferior a 3,7. Montañó et al. (1992) describen que los valores de pH mínimos para el crecimiento de las especies de *Pediococcus* y de *Leuconostoc* son 4,0 y 4,5 respectivamente e indican que las especies de *Lactobacillus* son, por el contrario, más ácido-tolerantes, presentando un pH mínimo de crecimiento de 3,8.

Otro hecho a destacar es la presencia de aislados del género *Lactococcus*, mucho más relacionado con otros alimentos fermentados como los lácteos, aunque también se hayan aislado en cereales fermentados como el pozol (Nuraida et al., 1995; Ampe et al., 1999), en vegetales fermentados como el kimchi (Kim y Chun, 2005) o se haya descrito su presencia en sauerkraut comercial (Harris et al., 1992).

La presencia de aislados del género *Leuconostoc* sí es por el contrario, muy habitual en las fermentaciones de vegetales, aceitunas, col ácida o pepinillos (Etchells et al., 1975; Vaughn, 1985; Fleming et al., 1985; Daeschel et al., 1987; Montaña et al., 1992), y junto con los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* son los que con mayor frecuencia participan en estas fermentaciones (Pederson, 1979).

La participación y sucesión de las diferentes especies de estos géneros en la fermentación depende de diversos factores como el tipo de producto y las condiciones del proceso y suele estar muy condicionada por su tolerancia a la acidez (McDonald et al., 1990). La temperatura es también un factor muy determinante y así, mientras que temperaturas inferiores a los 18 °C favorecen el crecimiento de las especies de *Leuconostoc*, temperaturas superiores a los 32 °C hacen que sea *L. plantarum* la especie predominante (Pederson y Albury, 1954). La época del año en la que se elabora la Berenjena de Almagro (Julio a Octubre) y la menor tolerancia al cloruro sódico descrita para las especies del género *Leuconostoc* explicarían la escasa presencia de aislados de este género y el hecho de que sólo se hayan aislado en las salmueras con menor concentración de este compuesto.

En cualquier caso la presencia de aislados de los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*, aunque minoritaria, nunca antes había sido descrita en la fermentación de las Berenjenas de Almagro.

5.3.1.3. Genotipado de los aislados

La técnica de lisis rápida utilizada para la obtención de los extractos crudos de ADN dio buenos resultados con todos los aislados de este estudio.

De los 6 cebadores ensayados, el OPL-05 y el Lp-1 proporcionaron perfiles de polimorfismo reproducibles, de elevada discriminación intraespecífica y con un número de bandas adecuado, bien distribuidas y con una buena separación, lo que facilitaba su análisis e interpretación. Con el cebador OPL-05 se obtenían perfiles con un número de bandas comprendido entre 5 y 10 de un tamaño entre 250 y 2840 pb, mientras que con el Lp-1 se obtuvieron perfiles

algo más complejos con un mayor número de bandas, entre 1 y 12 y con un mayor rango de tamaños, entre 100 y 3000 pb.

Las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción de PCR, variaron en cada caso. Para el OPL-05, fueron aquellas descritas en la Tabla 3.2 (Capítulo 3), y para el Lp-1 se recogen en la Tabla 5.4. Puede observarse que en este caso fue necesario cuadruplicar la concentración de este cebador.

TABLA 5.4. Concentración de los componentes de la mezcla de reacción de PCR utilizada con el cebador Lp-1

Componentes	Concentración del stock	Cantidad por reacción ($V_{\text{final}}=50 \mu\text{L}$)	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción	10×	5 μL	1×
4 dNTPs mix	25 mM (cada nucleótido)	4 μL	2 mM (cada nucleótido)
MgCl ₂	50 mM	2 μL	2 mM
Cebador Lp-1	25 pmol/ μL	8 μL	8 μM
ADN polimerasa *	1 U/ μL	1 μL	1 U
H ₂ O bidestilada estéril	-	31 μL	-
ADN molde	-	5 μL	-

*Añadir tras el primer ciclo

El programa de amplificación que muestra la Tabla 5.5 fue el que resultó adecuado para ambos cebadores.

TABLA 5.5. Programa de amplificación utilizado en la reacción de PCR

Nº de ciclos	Fase de desnaturalización	Fase de hibridación	Fase de extensión
1	5 min a 95 °C		
2	40 s a 94 °C	1 min a 45 °C	1 min a 72 °C
30	40 s a 94 °C	1 min a 52 °C	3 min a 72 °C
1			5 min a 70 °C

Una vez establecidas las condiciones óptimas del ensayo, se realizó el análisis de los aislados de cada una de las empresas. La Figura 5.4 muestra a modo de ejemplo, geles con los perfiles de polimorfismo de ADN (perfiles RAPDs) de diferentes aislados, obtenidos con los 2 cebadores.

Marcador
100 bp ladder

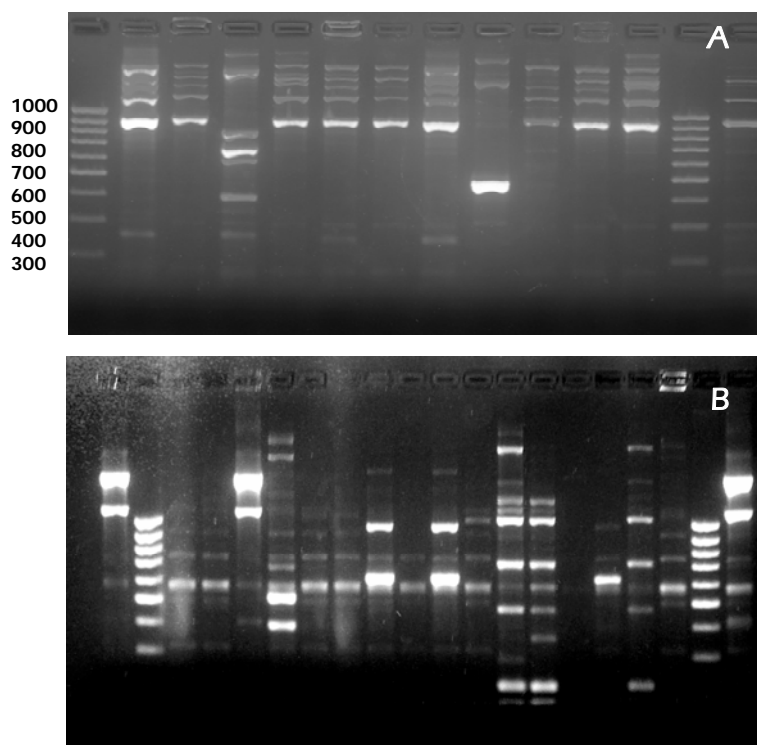
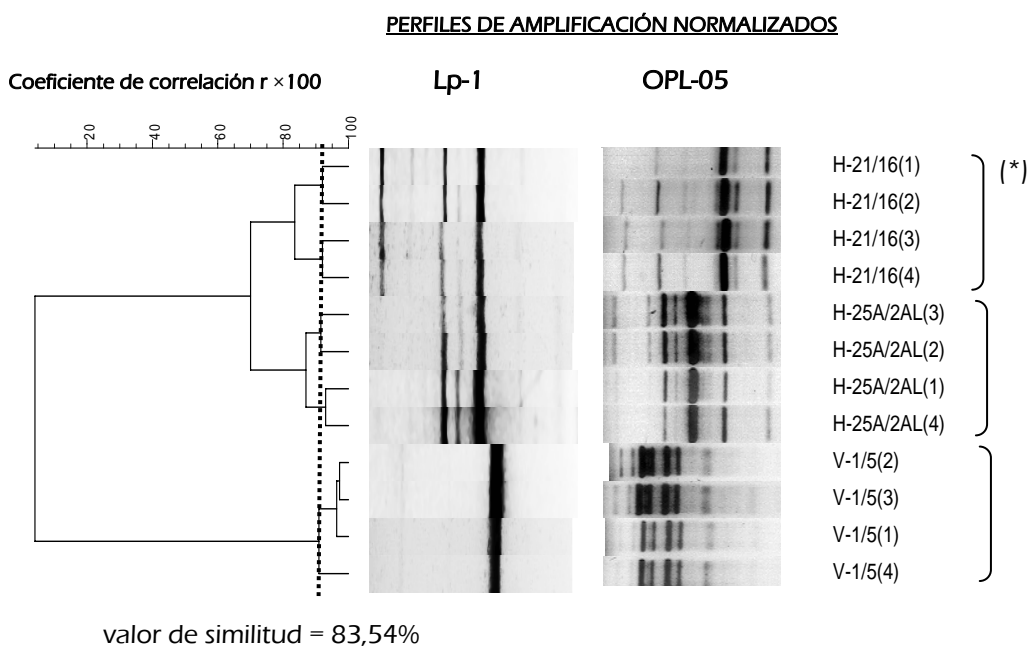


FIGURA 5.4. Perfiles RAPDs obtenidos con los cebadores OPL-05 (A) y Lp-1 (B)

Los 4 perfiles de polimorfismo obtenidos para cada uno de los 3 aislados utilizados en el estudio de reproducibilidad, con cada uno de los dos cebadores, fueron combinados y analizados numéricamente de forma conjunta, obteniéndose el dendrograma de similitud de la Figura 5.5.

La línea discontinua indica el mínimo valor de similitud ($r \times 100$), igual al 83,54%, obtenido en este estudio para perfiles de un mismo aislado. Este es por tanto el valor por encima del cual dos aislados podrán ser considerados clones de una misma cepa o pertenecientes a un mismo genotipo y por debajo del cual se considerará que son cepas o genotipos distintos. El valor de similitud

obtenido fue superior al 80%, mínimo exigido en estudios de reproducibilidad (Sneath y Jonson 1972).



(*) 1 y 2 corresponden a los perfiles RAPDs obtenidos en uno de los geles y 3 y 4 a los del otro gel

Figura 5.5. Perfiles de polimorfismo y dendrograma de similitud obtenidos en el estudio de reproducibilidad

Coincidiendo con lo descrito por otros autores (Sánchez et al., 2004), se observó que la capacidad de discriminación de cada cebador fue distinta y así por ejemplo, para los 24 aislados de la empresa B, se obtuvieron 15 perfiles RAPDs con el cebador OPL-05 y 13 con el Lp-1 (resultados no mostrados). El análisis combinado de los perfiles obtenidos con ambos cebadores incrementó la capacidad discriminante diferenciándose entonces los 20 genotipos mostrados en el dendrograma de la Figura 5.7. Son muchos los autores (Tailliez et al., 1998; Zapparoli et al., 1998; De Angelis et al., 2001; Simpson et al., 2002) que recomiendan realizar un análisis numérico combinado de los perfiles obtenidos con más de un cebador para incrementar así la eficacia discriminante de esta técnica.

Las Figuras 5.6, 5.7 y 5.8 muestran los dendrogramas consenso obtenidos tras el análisis cluster de los perfiles RAPDs combinados, obtenidos con ambos cebadores, de los aislados de cada una de las empresas.

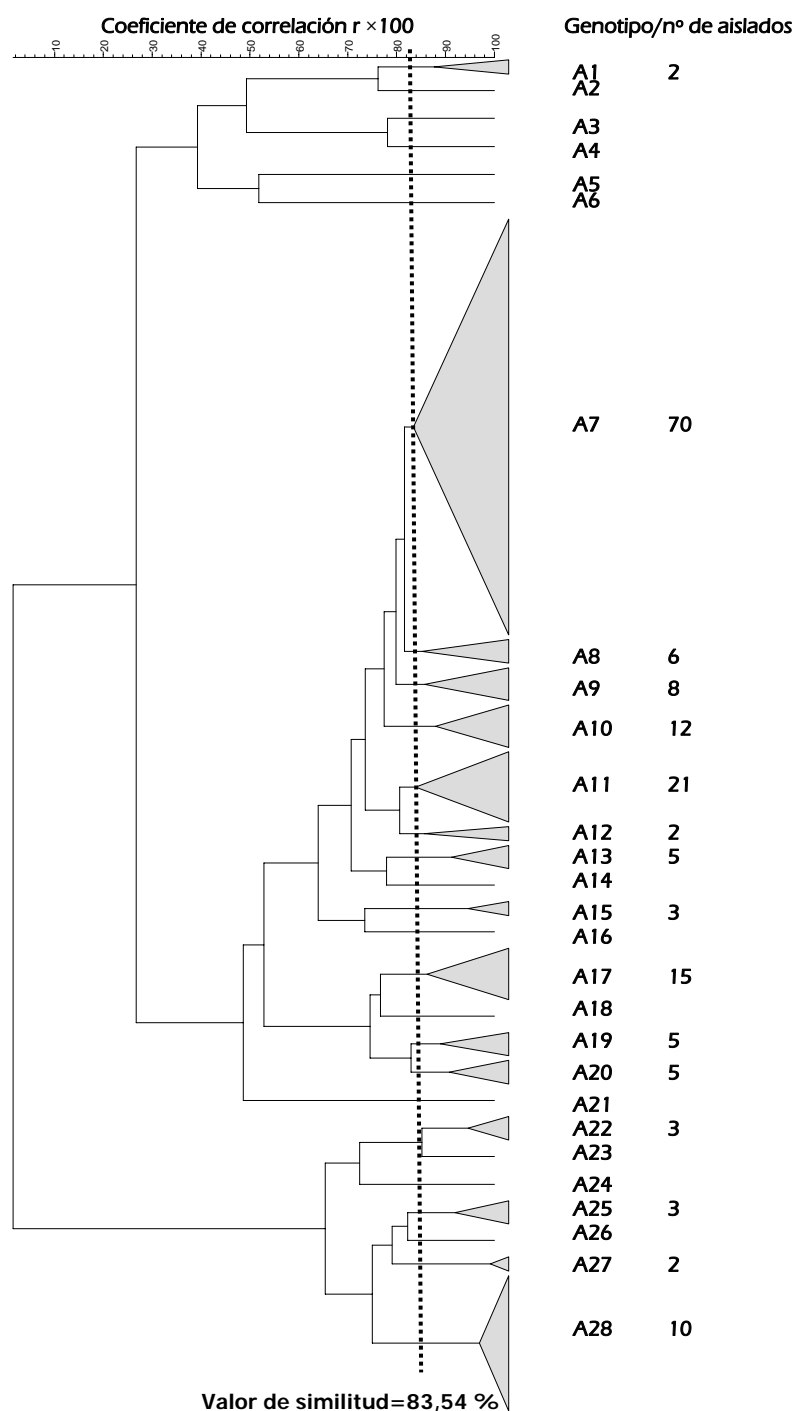


FIGURA 5.6. Dendrograma de similitud obtenido en el análisis cluster de los perfiles de amplificación (RAPDs) combinados de los cebadores OPL-05 y LP-1, de los aislados de la empresa A

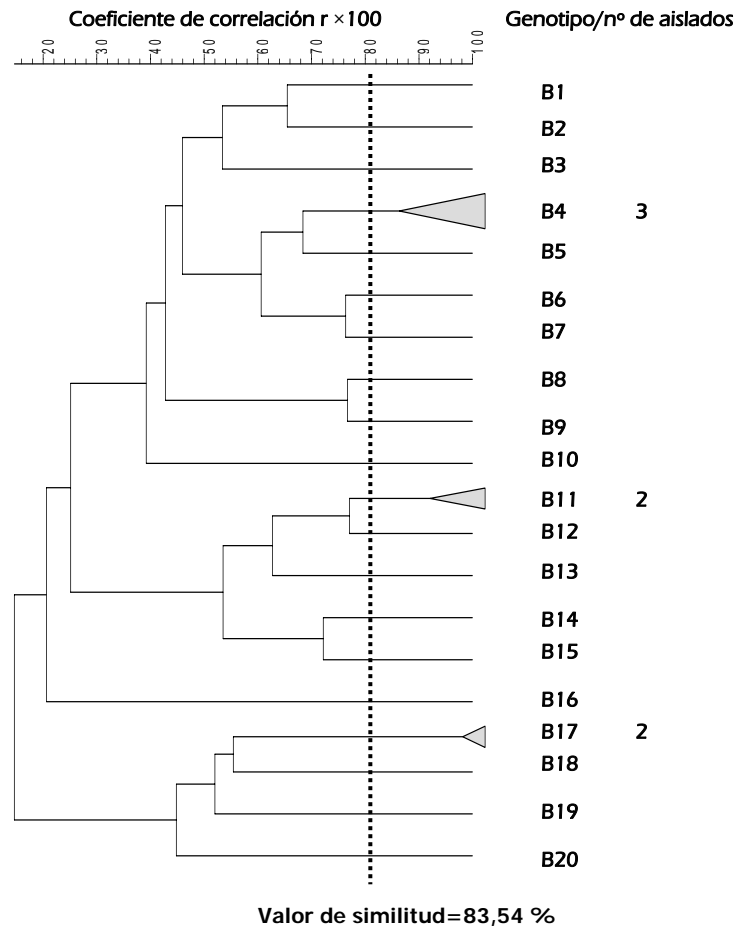


FIGURA 5.7. Dendrograma de similitud obtenido en el análisis cluster de los perfiles de amplificación (RAPDs) combinados de los cebadores OPL-05 y LP-1, de los aislados de la empresa B

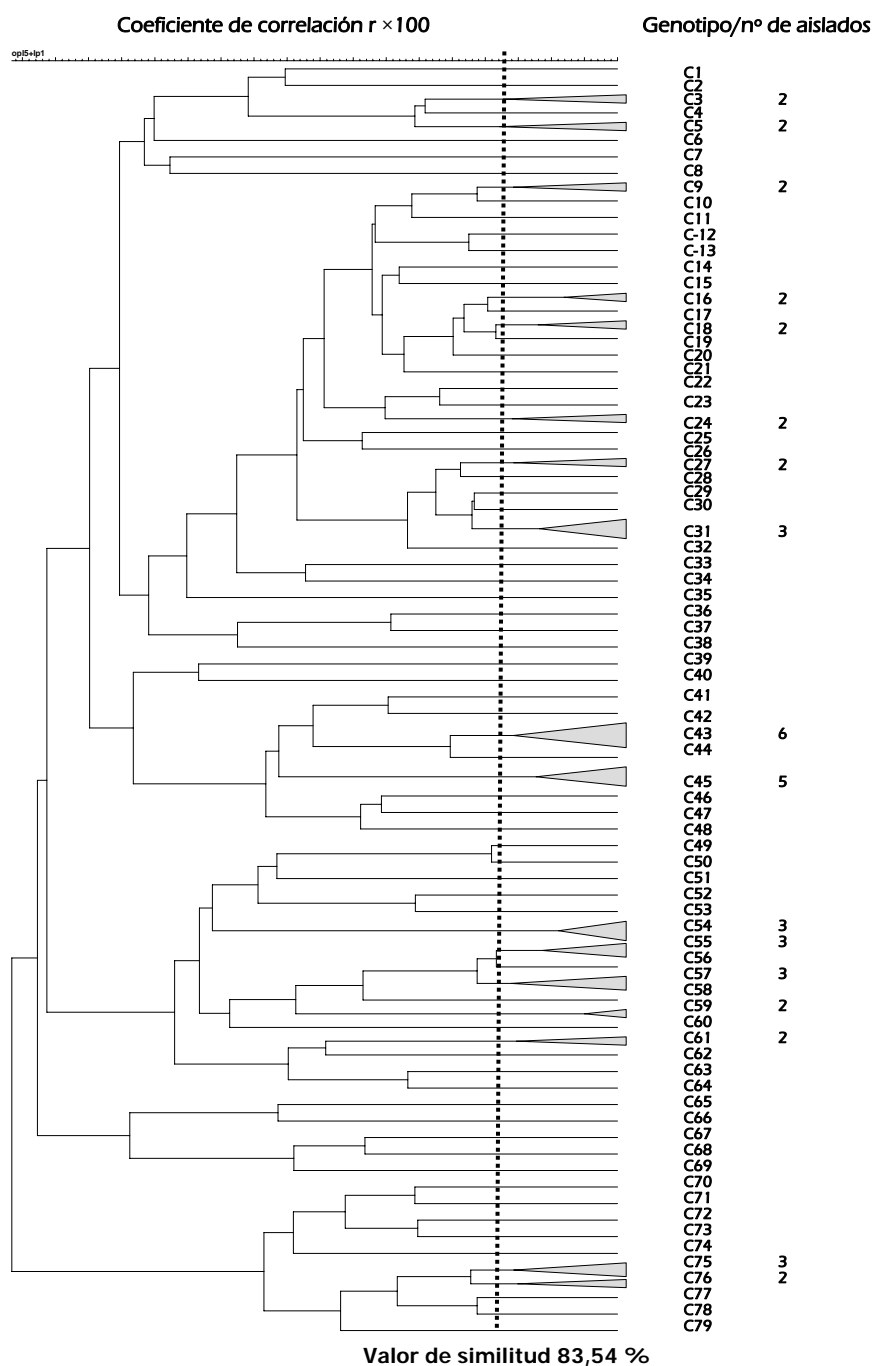


FIGURA 5.9. Dendrograma de similitud obtenido en el análisis cluster de los patrones de amplificación (RAPDs) combinados de los cebadores OPL-05 y LP-1, de los aislados de la empresa C

A un valor de similitud $r=83,54\%$, obtenido en el estudio de reproducibilidad, el nº de genotipos obtenidos en las empresas A, B y C fue de 28, 20 y 79 y la diversidad genética calculada como el cociente entre el nº de aislados y el nº de genotipos fue de 6,6, 1,2 y 1,4, respectivamente. La corta duración de la fermentación en la empresa A podría ser la responsable de la menor diversidad genética encontrada en la salmuera de esta empresa, ya que limitaría la posibilidad de obtener genotipos diferentes.

Tras realizar el genotipado se tomaron representantes de cada uno de los 127 genotipos, para su identificación. Los resultados de los ensayos de fermentación de carbohidratos y aquellos de los ensayos de crecimiento, permitieron establecer 10 grupos (I-X) (Tabla 5.6), que fueron identificados por el sistema informático APILAB PLUS como pertenecientes a las especies *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. brevis* biotipo 1, *L. brevis* biotipo 3, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Lc. lactis* subsp. *lactis*, respectivamente.

Es interesante destacar que la mayoría de los genotipos de las especies *L. fermentum* y *L. cellobiosus* fueron arginina negativo, a pesar de que éstas han sido descritas como arginina positivo (Wood y Holzapfel, 1995; Kandler y Weiss, 1986).

Entre los aislados de algunas especies como por ejemplo *L. cellobiosus*, coincidiendo con lo descrito por algunos autores (Molin et al., 1993; Johansson et al., 1995b), se observó una gran variabilidad en los patrones de fermentación obtenidos con las tiras API 50 CH, lo que en ocasiones hacía descender el % de identificación.

TABLA 5.6. Resultados de las pruebas fenotípicas

GRUPO	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Nº de aislados	34	129	5	68	24	21	1	19	6	9
CO ₂ de la glucosa	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
NH ₃ de la arginina	14	10	-	-	+	+	+	+	-	+
Crecimiento a:										
5 °C	-	-	-	-	-	-				
15 °C	80	76	+	+	26	78(10)				
45 °C	95	80	+	55(35)	65	80				
Crecimiento en presencia de:										
4% NaCl	+	+	+	+	+	+				
6,5% NaCl	25(28)	38(21)	+	+	80(5)	90(10)				
8% NaCl	-	-	+	92(6)	38	27				
Fermentación de azúcares:										
Glicerol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	d
L-Arabinosa	74	+	40	+	+	+	+	+	+	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	92	+
D-Xilosa	53	72	-	-	-	+	-	-	+	-
Galactosa	+	83	+	+	80	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	19	+	+	+	10	+	+	+	+
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	+	15	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
Sorbitol	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-manósido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α-metil-D-glucósido	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
N-acetil glucosamina	-	-	+	+	+	30	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	+	+	+	-	+	25	-	+
Arbutina	-	(24)	+	+	+	-	+	36	-	+
Esculina	-	76	+	+	+	d	+	+	-	+
Salicina	-	-	+	+	+	-	+	d	-	+
Celobiosa	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactosa	+	41	+	+	-	10	+	+	-	+
Melibiosa	+	89	+	+	-	10d	-	-	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Trehalosa	81	79	+	+	+	-	+	+	+	+
Melezitosa	-	-	+	38	8	-	+	-	-	-
D-Rafinosa	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
β-gentibiosa	-	-	+	+	d	-	-	+	-	+
D-Turanosa	-	-	-	-	20	-	+	-	+	-
D-Tagatosa	-	-	-	-	7	-	+	+	-	-
D-Arabitól	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gluconato	(78)	+	+	+	+	d	+	-	-	+
2-ceto gluconato	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
5-ceto gluconato	(79)	+	-	-	-	12	-	-	-	-
Configuración ác. láctico	DL	DL	DL	DL	DL	DL				L

Símbolos: +, reacción positiva; -, reacción negativa; d, reacción débil; 14, 14% de aislados reacción positiva; (10), 10% aislados reacción débil; DL, producen ácido láctico de las dos configuraciones. Ningún aislado fermentó: Eritritol, D-Arabinosa, L-Xilosa, Adonitol, β-metil-xilosido, L-Sorbosa, Inositol, Almidón, Glucógeno, Xilitol, D-Lixosa, D-Tagatosa, D-Fucosa, L-Fucosa. Todos los aislados ensayados fermentaron la Glucosa, la Fructosa y la Maltosa.

Las reacciones de PCR específicas efectuadas a los representantes de los 127 genotipos confirmaron en todos los casos las identificaciones anteriores. En aquellos de *L. cellobiosus*, y dado que en la bibliografía no fue posible encontrar las secuencias de cebadores específicos para esta especie, se pensó en utilizar aquellos de *L. fermentum*, basándonos en la tan controvertida separación de estas especies (Kandler y Weiss, 1986; Rogosa et al., 1953; Dellaglio y Torriani, 1986). De forma “nada” sorprendente observamos que en todos los genotipos de *L. cellobiosus* se amplificaba una banda de igual tamaño que aquella de los de *L. fermentum*, motivo por el cual, consideramos conveniente nombrar a todos los aislados pertenecientes a *L. fermentum* y *L. cellobiosus* como *L. fermentum/cellobiosus*. Estos resultados apoyan aquellos de Dellaglio et al. (2004), autores que han propuesto la reclasificación de la especie *L. cellobiosus* y su inclusión en *L. fermentum*.

La Figura 5.10 muestra a modo de ejemplo, un gel con los aislados pertenecientes a la especie *L. brevis*, en los que se observa la banda característica de 1340 pb.

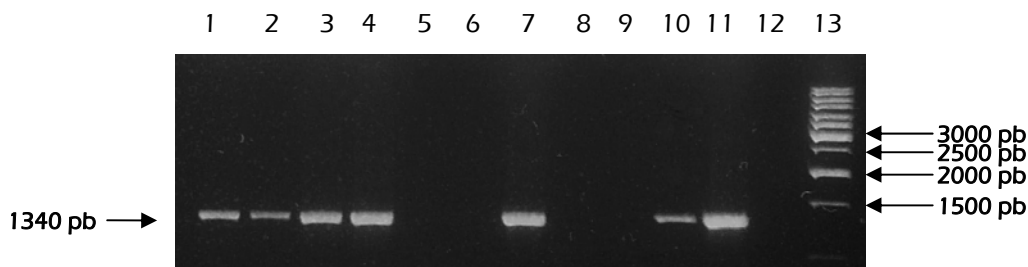


FIGURA 5.10. Productos de amplificación obtenidos utilizando los cebadores descritos por Guarneri et al. (2001). Línea 1: genotipo B8; línea 2: genotipo B9; línea 3: genotipo B10; línea 4: genotipo C50; línea 5: control negativo (sin ADN); línea 6: *L. fermentum* 285; línea 7: *L. brevis* 4121^T; línea 8: genotipo C48; línea 9: genotipo B11; línea 10: genotipo C54; línea 11: genotipo C75; línea 12: *L. cellobiosus* 562^T; línea 13: marcador Kb ladder (Biotools)

La Tabla 5.7 muestra a modo de resumen los genotipos incluidos en cada grupo y su identificación. En el caso de los *L. brevis* no se hace distinción entre los biotipos porque con la reacción de PCR ésta no es posible.

TABLA 5.7. Genotipos y su identificación

Grupo	Genotipos	Identificación por PCR específica	Total genotipos por especie	Total aislados por especie	Diversidad genética por especie
I	A-1/A-6 A-17/A-21	<i>L. fermentum/cellobiosus</i>	21	163	7,8
II	A-7/A-16	<i>L. fermentum/cellobiosus</i>			
III	A-22/A-24 A-25/A-28	<i>L. pentosus</i>	3	5	1,7
IV	B-17/B-20 C-1/C-38	<i>L. plantarum</i>	46	68	1,5
V	C-49/C-64	<i>L. brevis</i>			
VI	C-65/C-79 B-8/B-10	<i>L. brevis</i>	34	45	1,3
VII	B-16	<i>L. paracasei</i>	1	1	-
VIII	C-39/C-48	<i>L. acidophilus</i>	9	19	2,1
XIX	B-11/B-15	<i>Ln. mesenteroides</i>	5	6	1,2
X	B-1/B-7	<i>Lc. lactis</i>	8	9	1,1

La diversidad genética por especies calculada como el cociente entre el número de aislados de una especie y el número de genotipos de la misma, indicó que aquella con mayor diversidad era *Lc. lactis* seguida por *Ln.*

mesenteroides y *L. brevis*, y aquella con menor diversidad fue *L. fermentum* para la que se obtuvo un valor de 7,8.

Una cuestión de gran importancia en estudios ecológicos, es conocer la extensión y distribución de la diversidad microbiana en el medio natural. Este reciente enfoque de la ecología microbiana, denominado “biogeografía”, trata de averiguar si los microorganismos son “cosmopolitas”, encontrándose por tanto en más de una localización, o si por el contrario tienden a ser endémicos localizándose entonces en nichos específicos (Giraffa y Neviani, 2001).

Con los resultados del estudio de genotipado nos planteamos conocer que ocurriría con los aislados obtenidos en este estudio, que como ya hemos indicado, procedían de 3 empresas distintas, aunque no muy alejadas geográficamente. Para ello, realizamos un análisis cluster de los perfiles RAPDs de todos los aislados obtenidos con ambos cebadores, y obtuvimos el correspondiente dendrograma de similitud (datos no mostrados). Al aplicar el valor de similitud $r=83,54\%$, resultó que sólo 3 de los 127 genotipos, el A-25, B-17 y C-19 de *L. plantarum* se agrupaban en un mismo cluster.

Podría entonces concluirse que sólo una pequeñísima proporción (1,9%) de la microbiota espontánea que participa en estos procesos tiene carácter “cosmopolita”. Estos resultados son totalmente contrapuestos a los obtenidos por Marcellino et al. (2001), quienes en un estudio realizado con quesos de toda Francia, obtienen un porcentaje muy elevado de cepas “cosmopolitas”, llegando a afirmar que “existen cepas idénticas en toda Francia e incluso en el mundo”.

Sánchez et al. (2005) obtienen por el contrario resultados muy similares a los nuestros en un estudio realizado con quesos de cabra elaborados en Castilla-La Mancha.

La Figura 5.11 muestra la diversidad y porcentajes de participación de las especies identificadas en las salmueras de las distintas empresas.

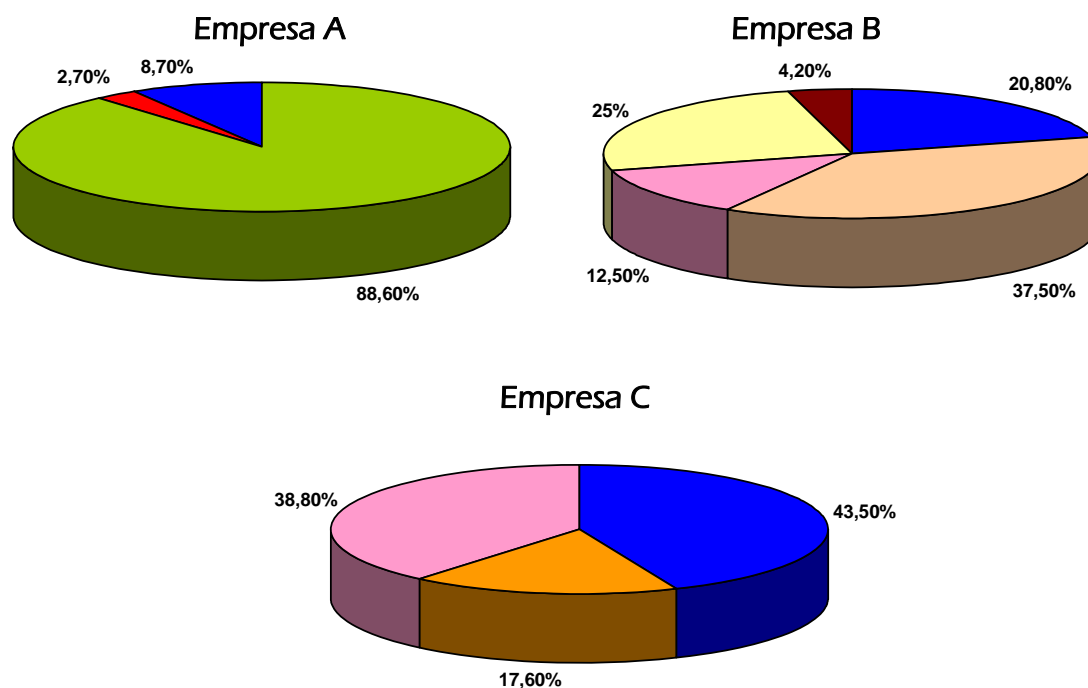


FIGURA 5.11. Porcentajes de participación de las especies identificadas. ■ *L. plantarum* ■ *L. pentosus* ■ *L. fermentum/cellobiosus* ■ *L. brevis* ■ *L. acidophilus* ■ *Lc. lactis* ■ *Ln. mesenteroides* ■ *L. paracasei*

Se observan importantes diferencias no sólo en la composición de la microbiota láctica sino también en la diversidad de especies. De forma sorprendente, la salmuera de la empresa B, a pesar del escaso número de aislados obtenidos, fue la que presentaba un mayor número de especies. Este hecho podría estar relacionado con la menor concentración de cloruro sódico utilizada en la salmuera de esta empresa, que no limitaría el crecimiento de ninguna de las especies integrantes de la microbiota epifítica. Parece existir una relación inversa entre la concentración de sal y la diversidad de especies participantes en el proceso.

Merece ser destacado el hecho de que sólo la especie, *L. plantarum* estuviera presente en las salmueras de las 3 empresas estudiadas, aunque los % de participación en cada caso fueron muy diferentes. La mayoría de los aislados

identificados como *L. plantarum* procedían de las salmueras de los últimos días de la fermentación, lo que como ya hemos indicado es habitual en este tipo de procesos por su mayor ácido-tolerancia.

La participación de distintas especies del género *Lactobacillus* en la fermentación de Berenjenas de Almagro, había sido descrita por Sánchez et al. (2000), pero cabe destacar que nunca antes se habían identificado las especies *L. paracasei* y *L. acidophilus*. De la primera de ellas no se han encontrado referencias bibliográficas que apoyen su participación en la elaboración de vegetales fermentados, sin embargo *L. acidophilus* ha sido aislado de fermentaciones de alimentos africanos tradicionales como el “Kunu-zarki” que se elabora con mijo o el “Kenkey” que se elabora con maíz (Olasupo et al., 1997).

5.3.1.4. Análisis Sensorial

Al aplicar el test de Friedman’s a los resultados de la prueba de preferencia con consumidores (Tabla 5.8) se puso de manifiesto que no existía preferencia significativa por ninguna de las muestras comerciales evaluadas. No obstante, las Berenjenas que resultaron ser las “más preferidas” un mayor número de veces, fueron las elaboradas en la empresa A.

TABLA 5.8. Resultados de la prueba de preferencia

	Comercial A	Comercial B	Comercial C
Preferencia ⁽¹⁾	17	4	9
Puntuación final ⁽²⁾	50	67	56

(1) no. de veces considerada “la más preferida”

(2) “mas preferida”=+1, “preferencia intermedia”=+2, “menos preferida”=+3.

Las características sensoriales de las Berenjenas evaluadas fueron, en opinión de los consumidores, muy diferentes, lo que unido a las distintas preferencias de los consumidores, fue lo que en nuestra opinión motivó que no se obtuvieran diferencias significativas en el tratamiento estadístico. Así, mientras algunos consumidores preferían una muestra por su intenso sabor a

vinagre, otros la consideraban la menos preferida al considerar que este no es un atributo de calidad.

5.3.2. Estudio comparativo de la microbiota que participa en la fermentación espontánea de las Berenjenas de Almagro en diferentes campañas

En este apartado se recogen los resultados del estudio comparativo de aquellos obtenidos por Sánchez et al. (2000), en muestras de salmuera tomadas en la empresa A en el año 1999 y los de las muestras tomadas dos campañas más tarde en la misma empresa.

Para el estudio de la diversidad genética fue necesario realizar el genotipado de los aislados obtenidos en ambas campañas, aunque Sánchez et al. (2004) describen la caracterización genética de los aislados procedentes de aquellas salmueras, ya que la reproducibilidad inter-laboratorios de algunas técnicas moleculares como la RAPD-PCR es muy limitada (Giraffa y Neviani, 2001).

Se analizaron entonces un total de 323 aislados, 139 procedían del estudio realizado por Sánchez et al. (2000) (Campaña I) y 184 habían sido obtenidos en este estudio (Campaña II). Se utilizó el cebador OPL-05, con el que se realizó el correspondiente estudio de reproducibilidad.

5.3.2.1. Análisis químico y microbiológico de las salmueras

La Tabla 5.9 muestra los valores de pH y de los recuentos microbianos obtenidos en las salmueras de ambas campañas.

La evolución del pH fue similar en ambas campañas, si bien en la campaña II el incremento que ocurre en las primeras horas fue algo menor. El análisis estadístico puso de manifiesto diferencias significativas entre estos valores, causadas muy probablemente por el menor valor inicial del pH de la salmuera de la campaña II. La capacidad tamponante de la salmuera evita además el que estos valores se igualen.

Tabla 5.9. Evolución del pH y de los recuentos microbianos en las salmueras de ambas campañas

Día	pH		Recuento de aerobios mesófilos totales		Recuento de bacterias lácticas	
	I	II	I	II	I	II
0	3,80±0,14 ^a	3,67±0,12	5,70±0,33	ND ^b	3,60±0,21	ND
1	3,96±0,22	3,77±0,03	8,88±0,25	6,78±0,05	7,81±0,31	5,85±0,09
2	4,05±0,05	3,85±0,05	9,75±0,16	7,62±0,28	8,30±0,25	8,33±0,08
3	4,03±0,41	3,87±0,11	9,26±0,08	8,48±0,21	8,41±0,16	8,18±0,11
4	3,96±0,32	3,78±0,17	8,64±0,11	8,52±0,13	8,20±0,30	8,00±0,20
5	3,91±0,25	3,75±0,13	8,60±0,34	8,56±0,06	8,36±0,34	7,82±0,26
6	3,91±0,14	3,75±0,09	8,53±0,23	8,31±0,16	8,45±0,21	7,50±0,37
7	3,91±0,21	3,75±0,07	8,49±0,19	8,82±0,39	8,48±0,41	7,49±0,21

^amedia±desviación standard ^bNo detectado

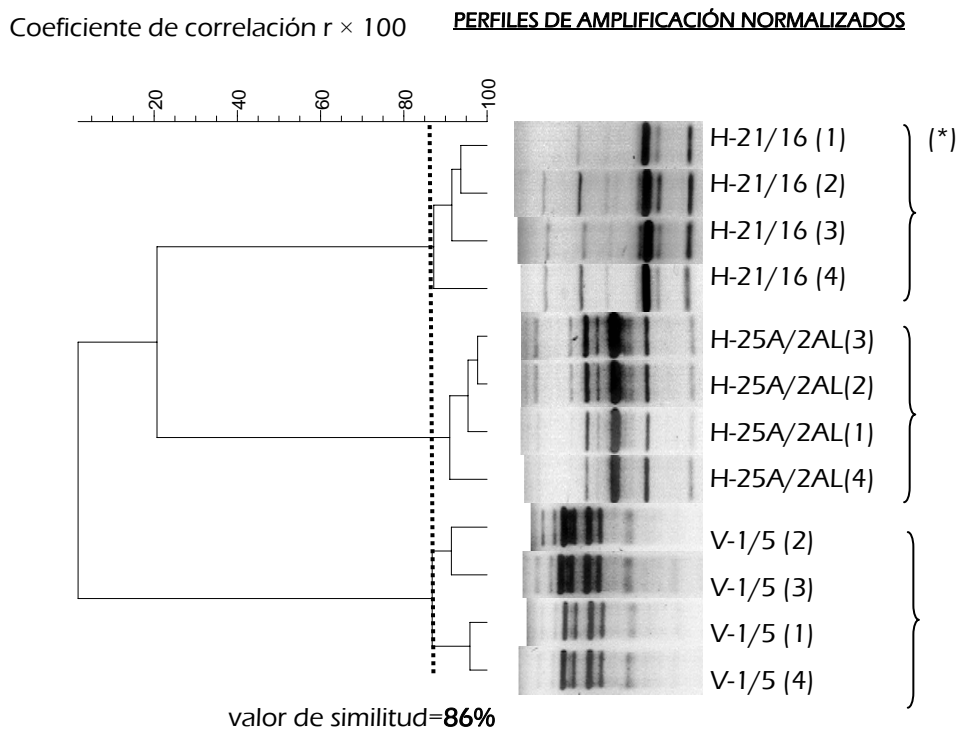
El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en los recuentos de aerobios mesófilos totales y de bacterias lácticas (Tabla 5.6) mostró que no existían diferencias significativas entre campañas.

5.3.2.2. Genotipado de los aislados

La Figura 5.12 muestra el dendrograma de similitud obtenido en el estudio de reproducibilidad con el cebador OPL-05 y el valor mínimo de similitud ($r \times 100$) igual al 86% obtenido para perfiles de un mismo aislado.

El análisis cluster de los perfiles RAPDs de los 323 aislados, obtenidos con el cebador OPL-05, originó el dendrograma de la Figura 5.13.

El valor del coeficiente de correlación cofenética fue de 0,97, indicando poca distorsión en el dendrograma obtenido a partir de la matriz de datos de similitud (Sokal y Rohlf, 1962).

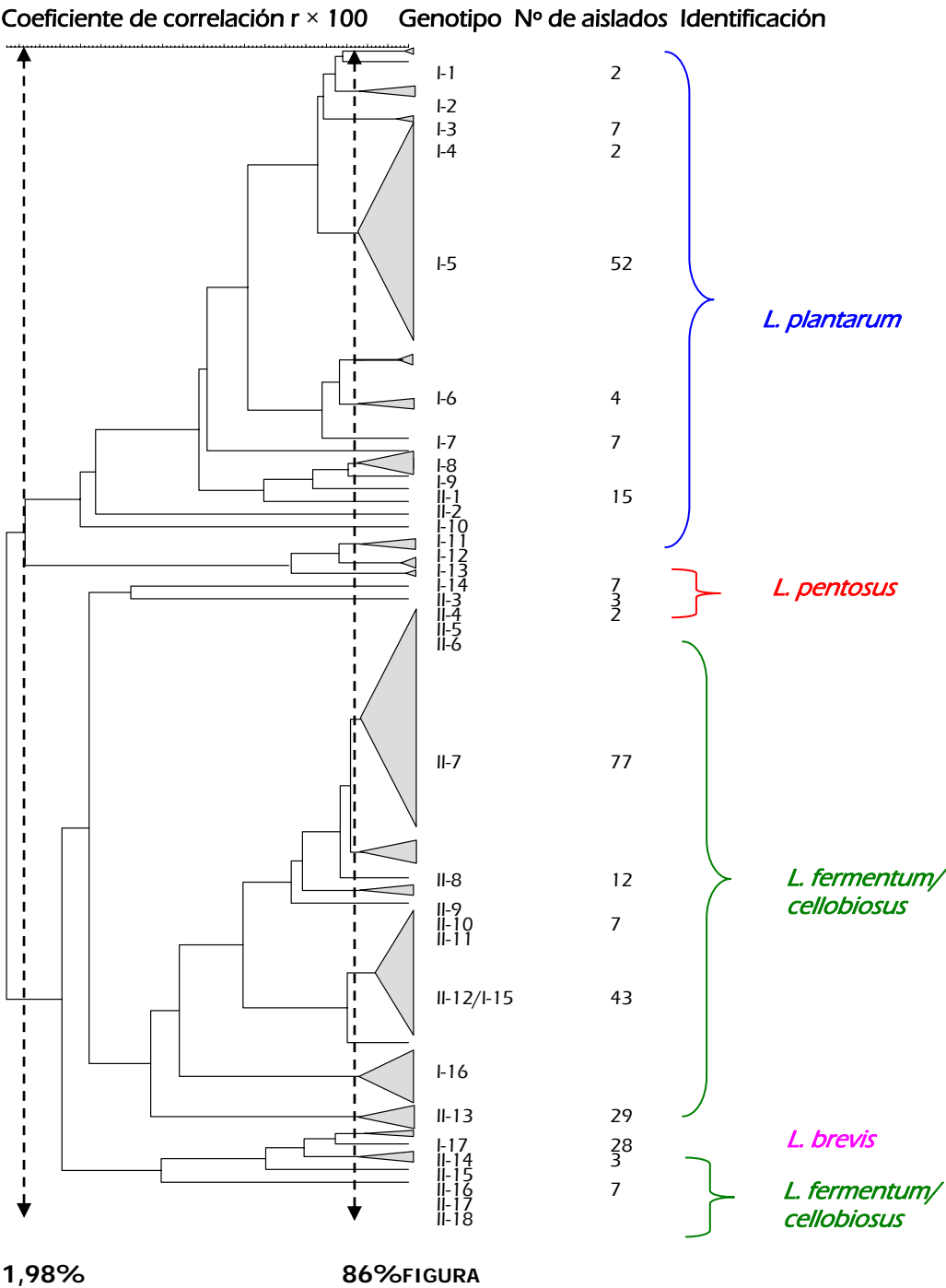


(*) 1 y 2 corresponden a los perfiles RAPDs obtenidos en uno de los geles, y 3 y 4 a los del otro gel.

FIGURA 5.12. Perfiles de amplificación y dendrograma de similitud obtenidos en el estudio de reproducibilidad

Al aplicar el valor de similitud del 86%, obtenido en el estudio de reproducibilidad, se diferenciaron 34 genotipos que han sido nombrados como I ó II según la campaña de origen (Figura 5.13). 307 de los aislados se agruparon en 18 clusters y los 16 restantes mostraron un perfil único.

Las pruebas de identificación fenotípicas realizadas a aislados representantes de cada cluster permitió su asignación a las especies indicadas en el dendrograma de la Figura 5.13, que se dispusieron en 5 clusters (I-V) principales a un $r=1,98\%$. Siguiendo el criterio adoptado anteriormente los aislados identificados como *L. fermentum* o *L. cellobiosus* han sido nombrados como *L. fermentum/cellobiosus*.



5.13. Dendrograma de similitud obtenido en el análisis cluster de los perfiles RAPDs obtenidos con el cebador OPL-05. I: Aislados obtenidos por Sánchez et al. (2000); II: Aislados obtenidos en este estudio

La identificación de los aislados de la campaña I, fue coincidente con la descrita por Sánchez et al. (2000), excepto en el caso de los incluidos en el cluster I-15 que habían sido identificados como *Lactobacillus* spp. y que ahora han sido identificados como *L. fermentum/cellobiosus*

Una diferencia notables entre ambas campañas fue la ausencia de aislados pertenecientes a la especie *L. brevis* en la campaña II.

Cabe destacar que los aislados de cada campaña se agruparon siempre en cluster diferentes, excepto aquel designado como I-12/II-15, que agrupó aislados de ambas campañas, procedentes en ambos casos de las salmueras de los 2 primeros días de fermentación.

La diversidad genética, calculada como el cociente entre el número de aislados y el número de genotipos obtenidos en cada campaña, fue más alta en las salmueras de la campaña I con un valor de 8,2 frente al 10,2 de la campaña II y en ambos casos, la diversidad fue muy inferior a la observada en salmueras de otras empresas.

Los porcentajes de participación de las especies identificadas fueron también muy diferentes en ambas campañas (Figura 5.14) y así, mientras que en las salmueras de la campaña II la especie predominante fue *L. fermentum/cellobiosus* con un porcentaje de participación del 88,5% en aquellas de la salmuera I lo había sido *L. plantarum* con un 58%.

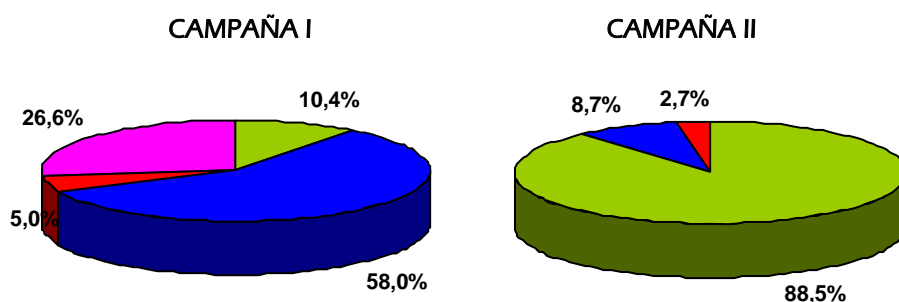


FIGURA 5.14. Porcentajes de participación de las especies de BL identificadas en ambas campañas. ■ *L. plantarum* ■ *L. pentosus* ■ *L. fermentum/cellobiosus* ■ *L. brevis*

La Figura 5.15 muestra la frecuencia de distribución y la sucesión de las especies en ambas fermentaciones.

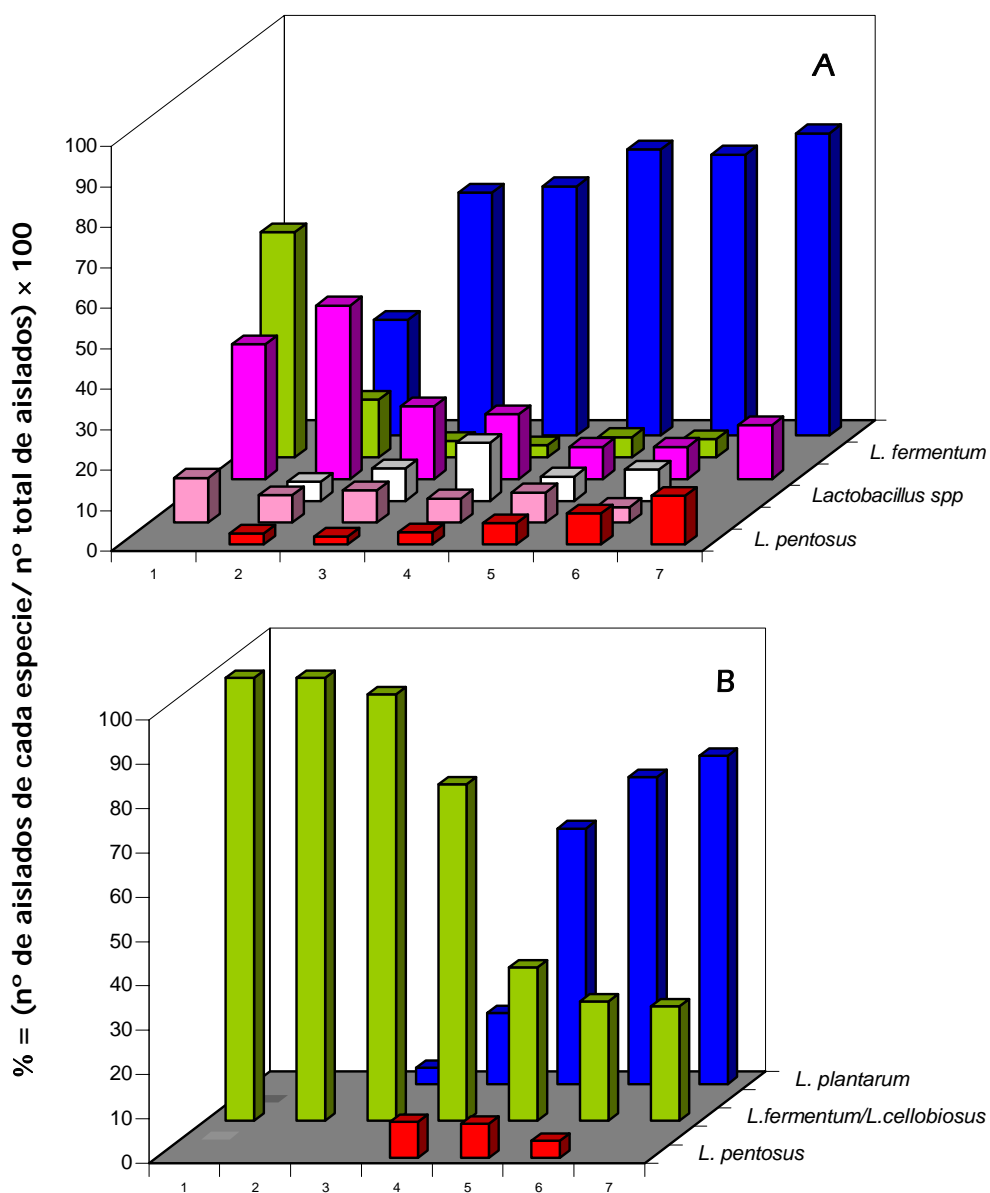


FIGURA 5.15. Frecuencia de distribución y sucesión de las especies de *Lactobacillus* en las salmueras tomadas en dos campañas diferentes. A: Campaña I (Sánchez et al., 2000) y B: Campaña II

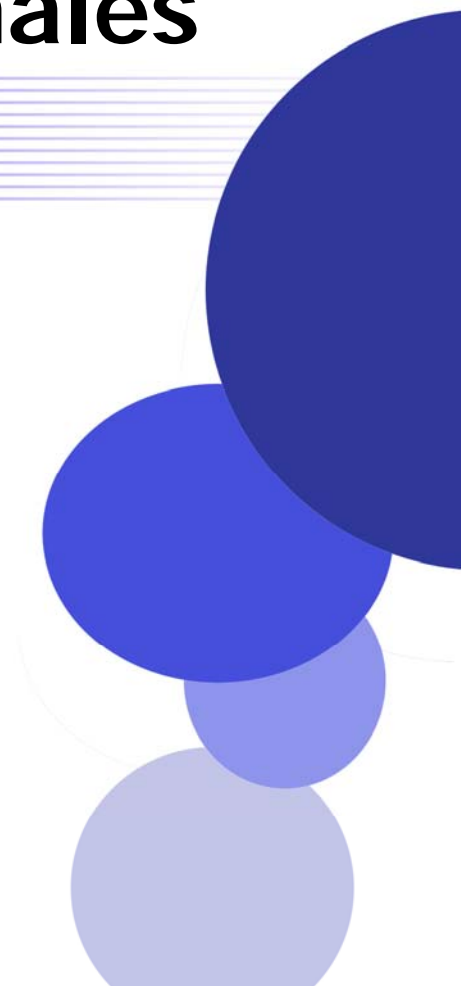
En ambos casos, al inicio de la fermentación predominan especies heterofermentativas como *L. fermentum/cellobiosus* (campaña II) o *L. brevis* (campaña I). Transcurridas las primeras 72 h se produce un descenso gradual de éstas que da paso a un predominio de especies homofermentativas como *L. plantarum* y *L. pentosus* que son las que finalizan el proceso. Una secuencia similar ha sido descrita en la fermentación de otros vegetales (Daeschel et al., 1987; Oyewole y Odunfa, 1990; Tamang y Sarkar, 1996; Kunene et al., 2000; Mugula et al., 2003).

5.4. CONCLUSIONES

De los resultados de este estudio puede concluirse que:

- ✓ Existen importantes diferencias en la composición de la microbiota láctica que participa en la fermentación de las Berenjenas de Almagro en distintas empresas elaboradoras, motivadas por la distinta concentración de cloruro sódico presente en las salmueras.
- ✓ Por vez primera se han identificado en las salmueras de fermentación de las Berenjenas de Almagro, las especies *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*.
- ✓ Los genotipos identificados en las salmueras de las distintas empresas estudiadas fueron distintos y sólo uno de los genotipos estuvo presente en las salmueras de las tres empresas estudiadas, y podría considerarse por tanto "cosmopolita".
- ✓ Al estudiar la composición de la microbiota láctica presente en las salmueras de una misma empresa, en 2 campañas diferentes, observamos que cuando las condiciones de elaboración se mantienen, las especies que participan son esencialmente las mismas, aunque los porcentajes de participación fueron sustancialmente diferentes.
- ✓ Los genotipos identificados en ambas campañas fueron distintos y sólo un pequeño porcentaje de la microbiota participante podría ser considerada "endémica" de la empresa de la que procedían las salmueras.
- ✓ Esta variabilidad genética aunque no parece esencial para el buen funcionamiento del proceso, si puede ocasionar modificaciones en las características sensoriales de las Berenjenas obtenidas, lo que se podría evitar utilizando un cultivo iniciador seleccionado.

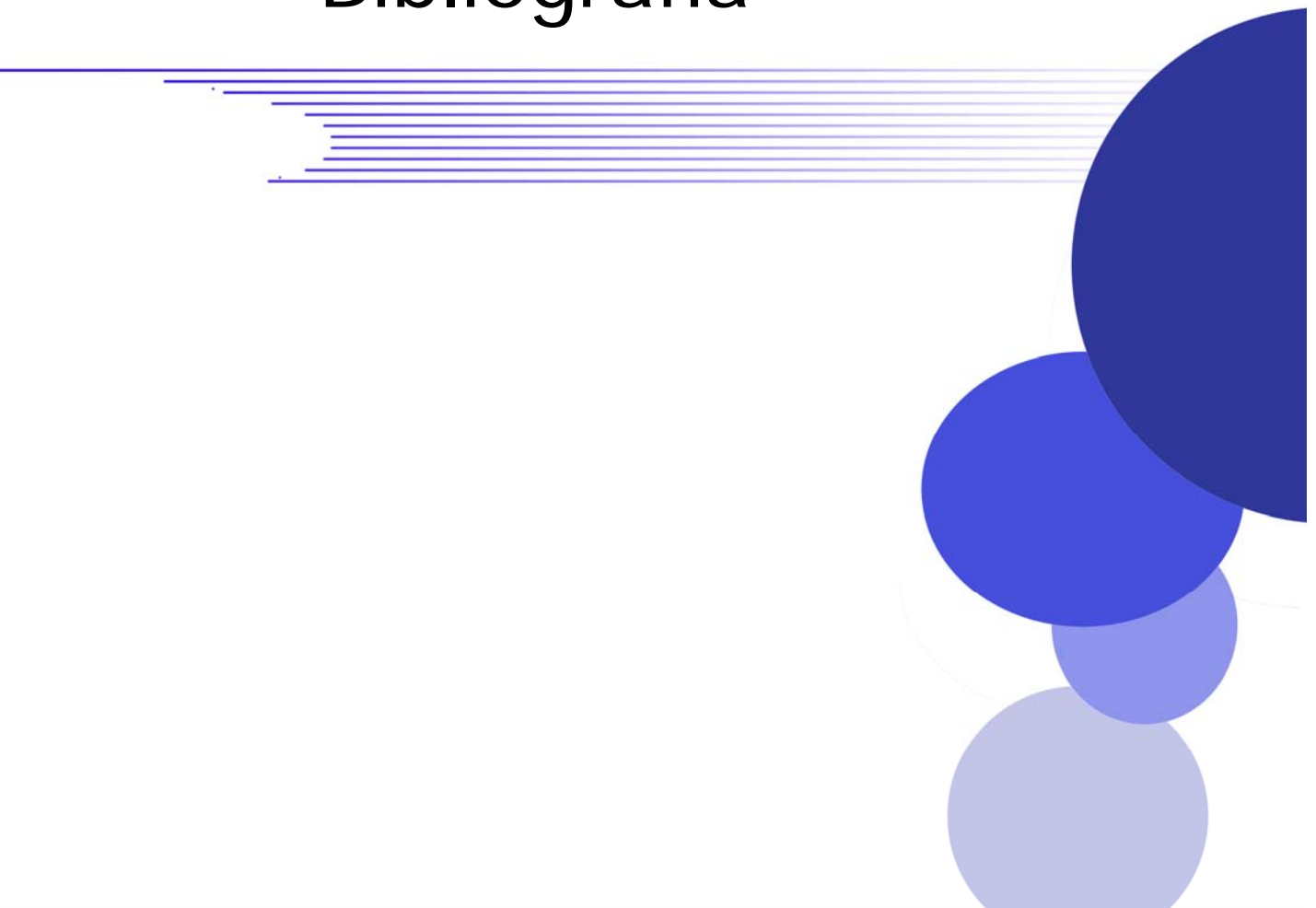
Conclusiones finales



CONCLUSIONES FINALES

1. El curso de la fermentación cuando se utilizaron frutos congelados en la elaboración de Berenjenas de Almagro fue similar a aquel con frutos no congelados, si bien ocurrió un ligero retraso en el inicio de la etapa de fermentación vigorosa. La congelación no sólo no afectó negativamente a las características sensoriales de las Berenjenas sino que éstas resultaron ser las preferidas por los consumidores.
2. La adición de cultivos iniciadores propios consigue acelerar la fermentación e incluso en algunos casos las características organolépticas de las Berenjenas obtenidas fueron mejores que las de algunas comerciales.
3. Se ha confirmado que muchas de las propiedades de interés tecnológico tienen carácter intraespecífico, por lo que la selección de un cultivo iniciador adecuado para la elaboración de las Berenjenas de Almagro requiere del estudio del potencial de las cepas que vayan a ser utilizadas para este fin.
4. El cultivo iniciador más adecuado ha resultado ser aquel constituido por una mezcla de especies homo y heterofermentadoras, siendo la cepa *L. fermentum* 6G1₄ una excelente candidata por su buena implantación en la fermentación de las Berenjenas de Almagro.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T. 1995. Pore-formation of bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 1-10.
- Ahn, C. y Stiles, M.E. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 302-310.
- Allison, G.E., Fremaux, C. y Klaenhammer, T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of 2 peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176, 2235-2241.
- Allouch, P., Sockaligum, G.D., Pina, P., Bouhedja, E.W. y Manfart, M. 1998. Utilisation de la spectrometrie infrarouge Transformée de Fourier en microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13, 18-20.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. y Guyot, J. P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5464-5473.
- Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. y Nissen-Meijer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: 2 new 2-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 2269-2272.
- APHA. 1976. Recommended methods for the microbiological examination of foods. American Public Association, Washington, USA.
- Archer, D.L. 2004. Freezing: an underutilized food safety technology?. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 127-138.
- Amoa-Awua, W.K.A. y Jakobsen, M. 1995. The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 250-256.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, Based, Hong Kong. 2nd Edition, pp. 1-72.
- Aymerich, M.T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1676-1682.

- Aymerich, M.T., Matín, B., Garriga, M., y Hugas, M.** 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4583-4594.
- Baird-Paker, A.C.** 1980. Organic acids. En: Microbial Ecology of Foods, Silliker, J.H. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 126-135.
- Ballesteros, C.**1996. Contribución al conocimiento científico de las Berenjenas de Almagro. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad Real.
- Ballesteros, C., Palop, L. y Sánchez, I.** 1999. Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of "Almagro" eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 13-20.
- Balatsouras, G., Tsibri, A., Dalles, T. y Doutsias, G.** 1983. Effects of fermentation and its control on the sensory characteristics of Conservolea variety green olives. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 68-74.
- Bartholomew, J.W.** 1962. Variables influencing results, and the precise definition of the steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. *Stain Technol.* 37, 139-155.
- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G. y Gresshoff, P.M.** 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* 38, 70-76.
- Beal, C., Deschamps, N., Juillard, V., de Roissart, H., Richard, J. y Saraux, B.**1994. Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. En: Bactéries Lactiques. Vol. 1. De Roissart, H., Luquet, F. M. (Eds.), Lorica, pp. 367-379.
- Beltz, D., Ludwing, W. y Scheleifer, K.H.** 1990. Identification of lactococci and enterococci by colony hybridation with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2927-2929.
- Ben Omar, N. y Ampe, F.** 2000. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3664-3673.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M., Franz, CM., Holzapfel, W.H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Cañamero, M. y Gálvez, A.** 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27 (1), 118-130.
- Berthier, F. y Ehrlich, S.D.** 1998. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 997-1007.

- Beutler, H.O. 1984. D-fructose. En: Methods of Enzymatic Analysis. Vol. VI. Bergmeyer, H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach FL. 3rd Edition, pp. 321-327.
- Beutling, D. 1996. Biogenic amines in nutrition. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 59-67.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.B. y Ray, B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Industrial Microbiol.* 2, 319-322.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.B. y Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 1-9.
- Björkroth, J., Ridell, J. y Korkeala, H. 1996. Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating with production of ropy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 59-68.
- Blaiotta, G., Moschetti, G., Simeoli, E., Andolfi, R., Villani, F. y Coppola, S. 2001. Monitoring lactic acid bacteria strains during 'Caciocotta' cheese production by restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Dairy Res.* 68, 139-144.
- Blasco, L., Ferrer, S. y Pardo, I. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225 (1), 115-123.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. y Sorokin, A. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403. *Genome Res.* 11, 731-753.
- Bourgeois, J. y Larpent, J. 1989. Les fermentations alimentaire. En: Microbiologie Alimentaire. Vol. II. TEC and DOC. Lavoisier, Paris.
- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2000. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages. *J. Food Prot.* 66, 185-189.

- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M. C.** 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 185-189.
- Brauman, A., Kéléké, S., Malonga, M., Miambi, E. y Ampe, F.** 1996. Microbiological characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (cassava flour) production. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2854-2858.
- Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P.F., Goodfellow, M. y Cogan, T.M.** 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 820-830.
- Brock, T.D.** 1987. The study of microorganisms in situ: progress and problems. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 41, 1-17.
- Brown, M.S.** 1979. Frozen fruits and vegetables: their chemistry, physics and cryobiology. *Adv. Food Res.* 25, 181-183.
- Buckenhüskes, H.J.** 1990. Processing and Quality of Foods. Vol 2. Zeuthen, P. (Ed.) Elsevier Applied Science, London & New York, pp. 2162-2187.
- Buckenhüskes, H.J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 253-272.
- Butturini, A., Aloisi, P., Tagliazucchi, R., y Cantoni, C.** 1995. Production of biogenic amines by enterobacteria and lactic acid bacteria isolated from meat products. *Ind. Aliment.* 34, 105-107.
- Canet, W.** 1985. Congelación de vegetales. *Alimentación, Equipos y Tecnología* Noviembre-Diciembre, 135-140.
- Canet, W. y Espinosa J.** 1983. Influencia del proceso de congelación sobre la textura de vegetales. Efecto del escaldado y la velocidad de congelación sobre la textura de zanahoria (*Daucus carota* L.). *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 23 (4), 531-540.
- Casaus, M.P.** 1998. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E. y Beaulieu, Y.** 1991. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Can. Inst. Sci. Technol. J.* 24 (3/4), 118-128.

- Charteris W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* 35 (1), 1-27.
- Chen, H. y Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2, 82-100.
- Christ, C., Lebeault, J.M. y Noel, C. 1980. Preparation of Sauerkraut U. S. Patent 4.242.361, Washington, D. C.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernández, P.E. y Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4321-4330.
- Cintas, L.M., Rodríguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (7), 2643-2648.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. y Comi, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5113-5121.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. y Comi, G. 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (4), 1883-1894.
- Cocconcelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L. y Bottazzi, V. 1997. Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population in natural whey culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 8-12.
- Cocconcelli, P.S., Porro, D., Galandini, S. y Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 376-379.
- Collins, E.B. y Aramaki, K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 63, 353-357.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. y Williams, A.M. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov. sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 453-460.

- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S. y Jones, D.** 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, y some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 310-316.
- Collins, M.D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martínez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M. y Wallbanks, S.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 5-12.
- Collins, M.D., Williams, A.M. y Wallbanks, S.** 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov.. *FEMS Microbiol. Lett.* 70, 255-262.
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S.** 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595-603.
- Condon, S.** 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 269-280.
- Coton, E., Rollan, G., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A.** 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 199-204.
- Coustere, C. y Fertil, B.** 1992. A nouvel outil pour l'analyse des données: les reseaux des neurones. Applications en microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 7, 10-14.
- Curk-Daubié, M.C.** 2000. Les outils actuels d'analyse de la diversité des bactéries lactiques. *Sciences des Aliments* 20, 19-36.
- Cusick, S. M. y O'Sullivan, D. J.** 2000. Use of a single, triplicate arbitrarily primed PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2227-2231.
- Daeschel, M.A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 7, 91-98.
- Daeschel, M.A.** 1992. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: Food Biopreservatives of Microbial Origin. Ray, B. y Daeschel, M. (Eds.), CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida, pp. 323-345.
- Daeschel, M.A., Anderson, R.E. y Fleming, H.P.** 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 357-367.

- Daeschel, M.A. y Fleming, H.P. 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.* 1, 303-313.
- Daeschel, M.A., Mckenney, M.C. y McDonald, L.C. 1990. Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.* 7, 91-98.
- Davey, G.P. y Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Microbiol.* 41, 84-89.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R. y Gobbetti, M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2011-2020.
- De Vos, W.M. y Vaughan, E.E. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 217-237.
- De Vuyst, L. y Vandamme, E.J. 1994 Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. De Vuyst, L. y Vandamme, E.J. (Eds.), Blackie Academic & Professional, London.
- Decallone, J., Delmée, M., Wauthoz, P., El Lioni, M. y Lambert, P. 1991 A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatographic analysis of the cellular fatty acids. *J. Food Prot.* 54, 217-224.
- Dellaglio, F., Bottazzi, V. y Vescovo, M. 1975. Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25, 160-172.
- Dellaglio, F. y Torriani, S. 1986. DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 83-92.
- Dellaglio, F., Torriani, S. y Felis, G.E. 2004. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 809-812.
- Dicks, L.M., Dellaglio, F. y Collins, M.D. 1995. Proposal to reclassifiy *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 395-397.
- Dicks, L.M.T. y Van Vuuren, H.J.J. 1987. Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 437-440.

DOCM [Diario Oficial de Castilla-La Mancha]. No. 36, 1994. Reglamento de la Denominación Específica de la Berenjena de Almagro y de su Consejo Regulador. Orden de la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente.

Donohue, D.C., Salminen, S. y Marteau, P. 1998. Safety of probiotic bacteria. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects, Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 2nd Edition, pp. 369-384.

Drake, M., Small, C.L., Spence, K.D. y Swanson, B.G. 1996. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 59, 1031-1036.

Du Plessis, E.M. y Dicks, L.M. 1995. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii*. *Curr. Microbiol.* 31, 114-118.

Duthoit, F., Godon, J.J. y Montel, M.C. 2003. Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3840-3848.

Dykes, G.A. y Von Holy, A. 1993. Taxonomy of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum packaged sausages by total soluble protein profiles. *J. Basic Microbiol.* 33, 169-177.

European Commission. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. Brussels, Belgium: Health and Consumer Protection Directorate-General.

European Community. 1999. Agenda Europea 2000.

Eklund, T. 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 2423-2429.

Ehrmann, M., Ludwig, W. y Schleifer, K.H. 1994. Reverse dot blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic acid bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 143-149.

Erkkilä, S., Suinko, M.L., Eerola, S., Petäjä, E. y Mattila-Sandholm, T. 2001. Dry sausages fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 205-210.

- Etchells, J.L., Bell, T.A. y Fleming, H.P.** 1973. Suggested procedure for the controlled fermentation of commercially brined pickling cucumbers. The use of starter cultures and reduction of carbon dioxide accumulation. *Pickle Pak. Sci.* 3, 4-14.
- Etchells, J.L., Fleming, H.P. y Bell, T.A.** 1975. Lactic acid bacteria in beverages and food. Carr, J.G., Cutting, C.V. y Whiting, G.C. (Eds.), Academic Press, London, New York, San Francisco.
- Farber, J.M.** 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food. Protect.* 59, 1091-1101.
- Ferchini, M., Frère, J., Mabrouk, K. y Manai, M.** 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 49-55.
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. y Beresford, T.** 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 337-340.
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. y Beresford, T.** 2001. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90 (4), 600-608.
- Fleming, H.P.** 1982. Fermented vegetables. En: Economic Microbiology. Fermented Foods. Rose, A. H. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 227-258.
- Fleming, H.P., Etchells, J.L. y Costilow, R.N.** 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Microbiol.* 30, 1040-1042.
- Fleming, H.P. y McFeeters, R.F.** 1981. Use of microbial cultures: vegetable products. *Food Technol.* 35, 84-88.
- Fleming, H.P., McFeeters, R.F. y Daeschel, M.A.** 1985. The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. En: Bacterial Starter Cultures for Foods. Gilliland, S.E. (Ed.), CRC Press, Florida.
- Fleming H.P., Thompson, R.L., Bell, T.A. y Hontz, L.H.** 1978. Controlled fermentation of sliced cucumbers. *J. Food Sci.* 43, 888-891.
- Fonseca, F., Beal, C. y Corrieu, G.** 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.* 67, 83-90.

- Fox, P.F., Lucey, J.A. y Cogan, T.M.** 1990. Glicolisis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29, 237-253.
- Fox, P.F. y Wallace, J.M.** 1997. Formation of flavor compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 43, 17-85.
- Fred, E.B., Peterson, W.H. y Anderson, J.A.** 1921. The characteristics of certain pentose destroying bacteria, specially as concerns their action on arabinose. *J. Biol. Chem.* 48, 385-412.
- Fredericq, P.** 1948. Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.* 19, 1-107.
- Furet, J.P., Quenee, P. y Tailliez, P.** 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 197-207.
- Fuster, C., Préstamo, G., Canet, W y Espinosa, J.** 1980. Criterios de calidad de vegetales congelados. Química y tecnología de alimentos. III Congreso Nacional de Microbiología.
- Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Stanton, C.** 1998. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2192-2199.
- Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M.** 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 142-148.
- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T., Arnau, J., y Monfort, J.M.** 1996. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 173-183.
- Garvie, E.I.** 1986. Genus *Leuconostoc* y genus *Pediococcus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (Eds.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland, pp. 1071-1079.
- Gatti, M., Contarini, G. y Neviani, E.** 1999. Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1450-1454.
- Gawenh, D. y Bergmeyer, H.U.** 1974. D(-) lactat. En: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 1538-1541.

- Geis, A., Singh, J. y Teuber, M. 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 205-211.
- Giesschner, K., Buckenhüskes, H., Gail, R. y Schneider, M., 1982. Neues verfahren zur herstellung von gärfischen sauerkraut in kleinverpackungen. *Ind. Obst. Gemüseverwert* 63 (3), 54-55.
- Gilarova, R., Voldrich, M., Demnerova, K., Cerovsky, M. y Dobias, J. 1994. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 315-319.
- Gilliland, S.E. 1985. Concentrated starter cultures. En: *Bacterial Starter Cultures for Foods*. Gilliland S.E. (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 145-157.
- Gilliland, S.E. y Speck, M.C. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and food-borne pathogens in associative culture. *J. Food Prot.* 40, 820-823.
- Giovannoni, S. 1991. The polymerase chain reaction. En: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (Eds.), John Wiley & Sons, England, pp. 177-203.
- Giraffa, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 251-260.
- Giraffa, G., Andrighetto, C., Antonello, C., Gatti, M., Lazzi, C., Marcazzan, G., Lombarda, A. y Neviani, E. 2004. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. *Int. J. Food Microbiol.* 91 (2), 129-139.
- Giraffa, G y Neviani, E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67 (1-2), 19-34.
- Goodacre, R., Timmins, E.M., Rooney, P.J., Rowland, J.J. y Kell, D.B. 1996. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 233-239.
- Gratia, A. 1946. Techniques selectives pour la recherche systematique des germes antibiotiques. C.R. *Seances Soc. Biol. Paris.* 140, 1053-1055.
- Gray, N.D. y Head, I.M. 2001. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environ. Microbiol.* 3, 481-492.

- Guarner, F. y Schaafsma, G.J. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 39 (3), 237-238.
- Guarneri, T., Rossetti, L. y Giraffa, G. 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 33 (5), 377-381.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in foods. *J. Appl. Microbiol.* 98 (6), 1316-1325.
- Gutmann, Y. y Wahlefeld, A.W. 1974. L(+) lactat Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. En: Methoden der enzymatischen Analyse. Bergmeyer, H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 1510-1514.
- Guyer, R.L. y Koshland, J.R. 1989. The molecule of the year. *Science* 246, 1543-1546.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5(2), 42-49.
- Hansen, E.B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 119-131.
- Harrigan, W.F. y McCance, M.E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, New York.
- Harris, L.J., Fleming, H.P. y Klaenhammer, T.R. 1992. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (5), 1477-1483.
- Hastings, J.W., Sailer, M., Jonhson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* 173, 7491-7500.
- Hayford, A.E., Petersen, A., Vogensen, F.K. y Jakobsen, M. 1999. Use of conserved Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fragments and RAPD pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3213-3221.
- Hécharde, Y., Derijard, B., Letellier, F. y Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2725-2731.
- Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic bacteria in

- human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 114-123.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L. y van Wassenaar, P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 5-12.
- Heyman, M. y Ménard, S. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1151-1165.
- Hitchener, B.J., Egan, A.F. y Rogers, P.J. 1982. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 52, 31-37.
- Holck, A.L., Axelsson, L., Birkeland, S., Aukrust, T. y Blom, H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2715-2720.
- Holt, J.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland. 9th Edition.
- Holzappel, W.F. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food. Microbiol.* 75, 197-212.
- Hoover, D.G. 1993. Bacteriocins with potencial for use in foods. En: Antimicrobials in Foods. Davidson, P.M. y Brannen, A.L. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. Nueva York, pp. 409-441
- Hounhouigan, D.J., Nout, M.J.R., Nago, C.M., Houben, J.H. y Rombouts, F.M. 1993. Characterization and frequency distribution of species of lactic acid bacteria involved in the processing of mawé, a fermented maize dough from Benin. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 279-287.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., y Monfot, J.M. 1993. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 107-113.
- Hung, Y.C. y Thompson, D.R. 1989. Changes in texture of green peas during freezing and frozen storage. *J. Food Sci.* 54(1), 96-101.
- Hurts, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85-123.
- Íñigo, R.M. y Abad, F.B. 1983a. Fermentación y nivel de histamina en aceitunas verdes. *Alimentaria.* 141, 33-41.
- Íñigo, R.M. y Abad, F.B. 1983b. Contenido en histamina en pepinillos encurtidos. *Alimentaria.* 147, 47-50.

ISO 1988a. Standard 8587: Sensory Analysis. Methodology. Ranking.

ISO 1988b. Standard 8589. Sensory analysis. Guide for the installation of a chamber for sensory analysis.

Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.

Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A. y Wollman, E. 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 84, 222-224.

Jay, J.M. 1982a. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 525-531.

Jay, J.M. 1982b. Effect of diacetyl on foodborne microorganism. *J. Food Sci.* 47, 1831-1836.

Jay, J.M., Rivers, G.M. y Boisvert, W.E. 1983. Antimicrobial properties of α -dicarbonyl and related compounds. *J. Food Prot.* 46, 325-330.

Jay, J.M. 1986. Modern food microbiology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.

Jayne-Williams, D.J. 1976. The application of miniaturized methods for characterisation of various organisms isolated from the animal gut. *J. Appl. Bacteriol.* 40, 189-200.

Jiménez-Díaz, R., Ríos-Sánchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. y Piard, J.C. 1995. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1416-1424.

Joerger, C. y Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167, 439-446.

Johansson, M.L., Quednau, M., Molin, G. y Ahrné, S. 1995a. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of *Lactobacillus plantarum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 155-159.

Johansson, M.L., Sanni, A., Likner, C. y Molin, G. 1995b. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 159-168.

Kandler, O. 1983a. Citado por Daeschel (1984) En: Highlights of the 40th Annual Meeting of the Society for Industrial Microbiology. *Food Microbiol.* 1, 79-81.

- Kandler, O. 1983b. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 49, 209-224.
- Kandler, O. y Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.C. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1234.
- Kim, M. y Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 91-96.
- Kimaryo, V.M., Massawe, G.A., Olasupo, N.A. y Holzapfel, W.H. 2000. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of "kivunde", a traditional Tanzanian food product. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 179-190.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337-349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-86.
- Klaenhammer, T.R. y Fitzgerald, G.F. 1994. Bacteriophage and bacteriophage resistance. En: Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Gasson, M.J. y de Vos, W.M. (Eds.), Chapman & Hall, London, England, pp. 106-168.
- Kleikemper, J., Schroth, M. H., Sigler, W.V., Schmucki, M., Bernasconi, S. M. y Zeyer, J. 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), 1516-1523.
- Kong, S. y Davison, A.J. 1980. The role of interactions between H₂O₂, OH, e⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 204, 13-29.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. y Poolman, B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opinion Microbiol.* 3, 276-282.
- Kunene, N.F., Geornaras, I., von Holy, A. y Hastings, J.W. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1084-1092.
- Kunji, E.R.S., Mieran, I., Hagting, A., Poolman, B. y Konings, W.N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 70, 187-221

Bibliografía

- Kunst, A., Draeger, B. y Ziegenhorn, J. 1984. D-Glucose. En: Methods of Enzymatic Analysis. Vol. VI. Bergmeyer, H.U. (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, FL. 3rd Edition, pp. 163-172.
- Lafuente, B. 1985. Nuevas orientaciones en la congelación de productos hortofrutícolas. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 25 (1), 25-41.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. y Pardo, I. 2005. Biogenic amines in wine from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1119-1124.
- Larpent, J.P. 1995. Las bacterias lácticas. En: Microbiología alimentaria. Ed. Acribia, S. A. Vol. 2, pp. 3-17.
- Law, B.A. y Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 49, 225-245.
- Leal-Sánchez, M.V., Ruiz-Barba, J.L., Sánchez, A.H., Rejano, L., Jiménez-Díaz, R. y Garrido, A. 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiol.* 20, 421-430.
- Le Bourgeois, P., Mata, M. y Ritzenthaler, P. 1989. Genome comparison of *Lactococcus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 59, 65-70.
- Leclaire, J. 1981. Processes, techniques and equipment in sauerkraut manufacture. *State Agric. Exp. Stn. Spec. Rep.* 38, 19-20.
- Leclerc, D. y Asselin, A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. J. Microbiol.* 35, 749-753.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen, M., van Noort, J.M. y Powels, P.H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141, 1629-1635.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food sci. technol.* 15, 67-78.
- Lewus, C.B., Sun, S. y Montville, T.J. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 143-149.
- Lindgren, S.E. y Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 149-164.

- Lortal, S., Rouault, A., Guezennec, S. y Gautier, M. 1997a. *Lactobacillus helveticus*: strain typing and genome size estimation by pulsed field gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* 34, 180-185.
- Lortal, S., Valence, F., Bizet, C. y Maubois, J.L. 1997b. Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Res. Microbiol.* 148, 461-474.
- Lucas, P. y Lonvaud-Funel, A. 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 85-89.
- Lund, B.M. 2000. Freezing. En: The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. I. Lund, B.M., Baird Parker, T.C. y Gould, G.W. (Eds.), Aspen Publishers, Gaithersburg, MD. pp.122-145.
- McDonald, L.C., Fleming, H.P., y Hassan, H.M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2120-2124.
- Mangin, I., Bourget, N., Bouhnik, Y., Bisetti, N., Simonet, J.M. y Decaris, B. 1994. Identification of *Bifidobacterium* strains by rRNA gene restriction patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1451-1458.
- Mangin, I., Bourget, N. y Decaris, B. 1996. Ribosomal DNA polymorphism in the genus *Bifidobacterium*. *Res. Microbiol.* 147, 183-192.
- Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.
- Marcellino, N., Beuvier, E., Grappin, R., Guéguen, M. y Benson, D.R. 2001. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrication in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4752-4759.
- Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., Izquierdo-Pulido, M., Venciana-Nogués, M.T. y Hernández-Jover, T. 1995. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim. Toxicol.* 88, 119-140.
- Martín, M. y Masoud, T.A. 1997a. Effect of freezing on nutritional quality of frozen eggplant. *Alimentaria* 285, 105-108.
- Martín, M. y Masoud, T.A. 1997b. Effect of freezing on nutritional quality of frozen eggplant. *Alimentaria* 285, 109-111.

- Matte-Tailliez, O., Quenee, P., Cibik, R., Van Opstal, J., Dessevre, F., Firmesse, O. y Tailliez, P.** 2001. Detection and identification of lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. *Lait* 81(1-2) 237-248.
- Mayr-Harting, A., Hedgess, A.J. y Berkeley, R.C.W.** 1972. Methods for studying bacteriocins. En: *Methods in Microbiology*. Bergen, T. y Norris, J.R. (Eds.), Academic Press, Inc., London, pp. 315-422.
- Mazurier, S., Van de Giessen, A., Heuvelman, K. y Wernars, K.** 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 260-262.
- McDonald, L.C., Fleming, H.P. y Hassan, H.M.** 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2120-2124.
- McMullen, L.M. y Stiles, M.E.** 1996. Potencial for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.* 64-71.
- Messens, W. y De Vuyst, L.** 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 31-43.
- Metivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.C., Marion, D., Cenatiempo, Y. y Fremaux, C.** 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with 2 disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* 144, 2837-2844.
- Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M.L., Ahrne, S., Nobaek, S., Stihl, M. y Bengmark, S.** 1993. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 314-323.
- Monnet, V. y Gripon, J.C.** 1994. Métabolisme azoté des bactéries lactiques. En: *Bactéries Lactiques*. Vol. 1. Ed. Loriga. pp. 331-347.
- Montaño, A., De Castro, A. y Rejano, L.** 1992. Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas y Aceites* 43, 352-360.
- Mora, D., Parini, C., Fortina, M.G. y Manachini, P.L.** 2000. Development of molecular RAPD marker for the identification of *Pediococcus acidilactici* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 400-408.
- Morales Mocino, A.** 1985. El cultivo y principios de comercialización de la berenjena de Almagro. *Proyecto Fin de Carrera*. E.U.I.T.A. (Ciudad Real).

- Mortvedt, C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. y Nes, I.J. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1829-1834.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F. y Coppola S. 2000. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 422-424.
- Mossel, D.A.A., Mengerink, W.H.J. y Scholts, H.H. 1962. Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 84, 381.
- Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A. y Sorhaug, T. 2003. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 187-199.
- Müller, T. 1990. Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Centralbl. Mikrobiol.* 145, 363-366.
- Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot.* 54-63.
- Mustapha, A., Jiang, T. y Saviano, D.A. 1997. Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 80, 1537-1545.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 38, 13-126.
- Naumann, D., Helm, D. y Labischinski, H. 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81-82.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S. y Brurberg, M.B. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 70, 113-128.
- Nes, I.F. y Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55, 50-61.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K. y Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174, 5686-5692.

- Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M. y Nes, I.F. 1993. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1973-1978.
- Nissen, H. y Dainty, R.H. 1995. Comparison of the use of rRNA probes and conventional methods in identifying strains of *Lactobacillus sake* and *L. curvatus* isolated from meat. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 311-315.
- Norris, J.R., Berkeley, R.C.W., Logan, N.A. y O'Donnell, A.G. 1981. The genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. En: *The Prokaryotes: A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Vol. 2. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A y Schlegel, H.G. (Eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 1711-1742.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T. y Vidal-Carou, M.C. 2000. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5117-5123.
- Nuñez, M y Medina, M. 1979. La flore lactique du forage bleu de Cabrales. *Le lait*, 59, 479-513.
- Nuraida, L., Wachter, C. y Owens, J.D. 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 567-571.
- Ocaña V.S, Pesce de Ruiz Holgado, A.A. y Nader-Macias, M.E. 1999. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr. Microbiol.* 38 (5), 279-284.
- Olasupo, N., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P. y Holzapfel, W.H. 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from "wara" a fermented skimmed cow milk product from West Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 438-441.
- Olasupo, N.A., Olukoya, D.K. y Odunfa. 1997. Identification of *Lactobacillus* species associated with selected african fermented foods. *Z. Naturforsch.* 52, 105-108.
- O'Mahony, M. 1986. *Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Orla-Jensen, S. 1919. *The lactic acid bacteria*. Anhr. Fred. Host and Son. Copenhagen.
- O'Sullivan, D.J. y Klaenhammer, T.R. 1993. Rapid mini-prep isolation of high quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2730-2733.

- Ouwehand, A.C.** 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional aspects. Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 2nd Edition, pp. 139-159.
- Oyewole, O.B. y Odunfa, S.A.** 1990. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 145-152.
- Parés, R. y Juárez, A.** 1997. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverté, S. A.
- Paulus, K. y Reisch, A. M.** 1980. The influence of temperature on the threshold values of primary tastes. *Chemical Senses* 5, 11-21.
- Pederson, C.S.** 1979. Microbiology of food fermentations. Avi Publishers, West Port, Connecticut, 2ª Edición.
- Pederson, C.S. y Albury, M.N.** 1954. The influence of salt and temperature on the microflora of sauerkraut fermentation. *Food Technol.* 8, 1-5.
- Persing, D.H.** 1993. In vitro nucleic acid amplification techniques. En: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Persing, D.H. Smith, T.F. Tenover, F.C. y White, T.J. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C. USA, pp. 51-87.
- Piard, J.C. y Desmazeaud, M.** 1991. Inhibitions factors produced by lactic acid bacteria 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 72, 525-541.
- Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J. y Klaenhammer, T.R.** 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 279-284.
- Picque, D., Perret, B., Latrille, E. y Corrieru, G.** 1992. Characterization and classification of lactic acid bacteria based on their acidification kinetics. *Lebensm-Wiss Technol.* 25, 181-186.
- Pinzani, P., Bonciani, L., Pazzagli, M., Orlando, C., Guerrini, S. y Granchi, L.** 2004. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 38 (2), 118-124.
- Pintado, J., Guyot, J.P. y Ampe, F.** 2003. Multiple competitive PCR-DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of lactic acid bacteria during

- production of probiotics from complex polysaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 95, 921-933.
- Plengvidhya, V., Breidt, F. Jr. y Fleming, HP.** 2004. Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 93 (3), 287-296.
- Poolman, B.** 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 125-148.
- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K. y Schleifer, K. H.** 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 139, 513-517.
- Pot, B., Vandamme, P. y Kersters, K.** 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. En: Chemical Methods in ProKaryotic Systematics. Goodfellow, M. y O'Donnell, A.G.N. (Eds.), York John Wiley and Sons Ltd.
- Price, R.J. y Lee, J.S.** 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide produced by lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* 33, 13-18.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, R.E.R., Kunka, B.S. y Vandenberg, P.A.** 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2349-2353.
- Quere, F., Deschamps, A. y Urdaci, M.C.** 1997. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 82, 783-790.
- Quiberoni, A., Tailliez, P., Ouénée P., Suárez, V., Reinheimer, J.** 1998. Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 85, 591-596.
- Radler, F.** 1975. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. En: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Carr, L.G., Cutting, C.V. y Whiting, G.C. (Eds.), Academic Press, London.
- Ramos, M.S. y Harlander, S.K.** 1990. DNA fingerprinting of lactococci and streptococci used in dairy fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 368-374.
- Reinheimer, J.A. y Demkov, M.R.** 1989. Production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria. Influence of culture conditions and effect on coliform bacteria growth. *Microbiol. Alimentos Nutr.* 7, 367-376.

- Rizzo, A.F., Korkeala, H. y Mononen, I. 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2883-2888.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 412-422.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 197-207.
- Rodtong, S. y Tannock, G.W. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3480-3484.
- Rodrigo, M., Alvarruiz, A., Alvarruiz, A.N., Villa, R. y Feria, A. 1985. Fermentación láctica dirigida de pepinillos frescos y calidad del producto final. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 25 (1), 104-116.
- Rodrigo, M., Alvarruiz, A., Vila, R., Feria, A. y Safón, J. 1984. Fermentación láctica dirigida de pepinillos prealmacenados. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 24 (3), 365-377.
- Rodrigo, M., Lázaro, M.J., García, G., Conesa, F., Safón, J. 1992. Pilot study of cucumber fermentation: diffusing gases and bloater damage. *J. Food Sci.* 57, 155-160.
- Rodrigo, M. y Martínez, A. 1991. Aplicaciones industriales del vinagre. Tecnología de encurtidos. En: El vinagre de vino. Edición CSIC, pp. 147-182.
- Rodrigo, M., Durán, L., Cuñat, P., Fuster, V. y Portela, E. 1969. Especificaciones del proceso de fermentación de encurtidos de pepinillos. *Inf. Res. A/CV.* 48, cd. IATA.
- Rodrigues, U.M., Aguirre, M., Facklam, R.R. y Collins, M.D. 1991. Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 509-516.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. y Wiseman, R.F. 1951. A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.* 62, 132-133.
- Rogosa, M., Wiseman, R.F., Mitchell, J.A., Disraely, M.N.H. y Beaman, A.J. 1953. Species differentiation of oral lactobacilli from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. *J. Bacteriol.* 65, 681-699.
- Ross, R.P., Morgan, S. y Hill, S. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3-16.

- Roushdy, I.M., Ehrmann, M.A. y Vogel, R.F. 1998. Molecular identification and characterization of halo-tolerant lactic acid bacteria isolated from soft pickled 'Domati' cheese. *Adv. Food Sci.* 20, 40-45.
- Roy, D., Sirois, S. y Vincent, D. 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr. Microbiol.* 42 (4), 282-289.
- Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. y Jiménez-Díaz, R. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2059-2064.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. y Gorbach, S.L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. Salminen, S. y Von Wright, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 2nd Edition, pp. 211-253.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. y Metaxopoulos, J. 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 179-196.
- Samelis, J., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J. y Kalantzopoulos, G. 1995. Differentiation of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* isolated from naturally fermented Greek dry salami by SDS-PAGE of whole-cell proteins. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 157-163.
- Sánchez, I. 2002. Contribución al conocimiento de la microbiota láctica que participa en la fermentación espontánea de las "Berenjenas de Almagro". Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha.
- Sánchez, M.T., Hermida, J.R., Cano, G. y Torralbo, F. 1994. Influencia del proceso de congelación sobre la textura del espárrago blanco. Efecto del escaldado y la velocidad de congelación. *Alimentaria* 251, 73-77.
- Sánchez, I., Palop, L. y Ballesteros, C. 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of "Almagro" eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 9-17.
- Sánchez, I., Seseña, S. y Palop, L. 2003. Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of "Almagro" eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 181-189.

- Sánchez, I., Seseña, S. y Palop, L.I. 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with "Almagro" eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA and Pulsed-Field Gel Electrophoresis patterns. *J. Appl. Microbiol.* 97 (2), 446-458.
- Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J.M., Cabezas, L. y Palop, L.I. 2005. Phenotypic and genotypic characterization of lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 355-362.
- Schillinger, U. 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: *Biotechnology and Food Safety*. Bills, D.D. y Kung, S. (Eds.), Butterworth-Heinemann, Stoneham, Massachussets, pp. 55-74.
- Schillinger, U. y Lücke, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4, 199-208.
- Schillinger, U. y Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. y Amann, R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5, 1081- 1094.
- Shalaby, A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675-690.
- Sharpe, M.E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. En: *Identification methods for microbiologists*. Soc. Appl. Bacteriol. Techn. Series, no. 14. Skinner, L. y Lovelock, D.W. (Eds.), Academic Press, London. 2nd edition, pp. 233-259
- Shaw, B.G. y Harding, C.D. 1984. A numeral taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 25-40.
- Silla Santos, M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213-231.
- Silla Santos, M.H. 1998. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 227-230.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. y Ross, R.P. 2002. Genomic diversity within genus *Pediococcus* as revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 765-771.

- Smith J.L. y Palumbo, S.A. 1981. Microorganisms as food additives. *J. Food Prot.* 44, 936-955.
- Smith J.L. y Palumbo S.A. 1983. Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* 46, 997-1006.
- Sneath, P.H.A. y Johnson, R. 1972. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *J. Gen. Microbiol.* 72, 377-391.
- Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman, W.H. (Ed.), San Francisco.
- Sokal, R.R. y Michener, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38, 1409-1438.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11, 30-40.
- Song, Y.L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C.X., Kato, H. y Watanabe, K. 1999. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3062-3064.
- SPSS Programa para Windows (version 10.0). 2000. Licencia UCLM.
- Stadhouders, J., Hup, G. y Jansen, L.A. 1971. A study of the optimum conditions of freezing and storing of concentrated mesophilic starters. *Neth. Milk Dairy J.* 23 (4), 229-239.
- Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K.M., Remaut, E., Le Page, R.W. y Wells, J. M. 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.* 66, 3183-3189.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 70, 331-345.
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.
- Stratton, J., Hutkins, R.W. y Taylor, S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. *J. Food Protect.* 54, 460-470.
- Swaminathan, B. y Matar, G. M. 1993. Molecular typing methods. En: Diagnostic molecular microbiology. Principles and Applications. Persing, D.H. Smith, T.F.

- Tenover, F.C. y White, T.J. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D. C. USA, pp. 26-50.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
- Tailliez, P., Tremblay, J., Ehrlich, S.D. y Chopin, A. 1998. Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 530-538.
- Tamang, J.P. y Sarkar, P.K. 1996. Microbiology of mesu, a traditional fermented bamboo shoot product. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 49-58.
- Taylor, S. L. 1985. Monograph, World Health Organization. 1-47.
- Taylor, S.L., Leatherwood, M. y Lieber, E.R. 1978. Histamine in sauerkraut. *J. Food Sci.* 43, 1030-1032.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. y Huis in 't Veld, J.H.J. 1990. Occurrence and formation of biologically amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.
- Teuber, M. y Perreten, V. 2000. Role of milk and meat products as vehicles for antibiotic-resistant bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica* 93, 75-87.
- Tharrington, G. y Sorrells, K.M. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by milk culture filtrates from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *J. Food Prot.* 55, 524-544.
- Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F. y Hammes, W.P. 1992. Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 460-468.
- Torriani, S., Felis, G.E. y Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3450-3454.
- Thomas, T.D. y Mills, O.E. 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 35, 255-273.
- Tsvetkov, T. y Shishkova, I. 1982. Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. *Cryobiology* 19, 211-214.
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. y Saxelin, M. 1999. Comparison of ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3908-3914.

- Universidad de Castilla-La Mancha.** Abril, 1997. Fabricación de Berenjenas de Almagro a partir de frutos congelados. Patente Española P-9700957.
- Valles, E. y Mocquot, G.** 1968. Preparation de suspensions concentrées et congelées de bactéries lactiques thermophilus, destinées à la fromagerie. *Le Lait* 48, 397-408.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438.
- van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Geis, A., Kok, J. y Venema, G.** 1991. Organization and nucleotide sequences of 2 lactococcal bacteriocins operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 492-498.
- Vaughn, R.H.** 1985. The Microbiology of Vegetable Fermentations. En: Microbiology of Fermented Foods. Vol. 1. Wood, B.J.B. (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, pp. 49-109.
- Vaughan, E.E., Caplice, E., Looney, R., O'Rourke, N., Daly, C. y Fitzgerald, G.F.** 1994. Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 118-123.
- Vaughan, E.E., Daly, C. y Fitzgerald, G.F.** 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 299-308.
- Vauterin, L. y Vauterin, P.** 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiol.* 1, 37-41.
- Vlaemynck, G., Herman, L. y Coudijzer, K.** 1994. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 211-225.
- Vescovo, M., Scolari, G.L. y Botazzi, V.** 1992. Plasmid profile and curing in *Lactobacillus casei* isolated from Grana cheese. *Microbiol. Aliment. Nutr.* 10, 401-406.
- Vescovo, M., Torriani, S., Dellaglio, F. y Bottazi, V.** 1993. Basic characteristics, ecology and application of *Lactobacillus plantarum*. A review. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 43, 261-284.
- Veyrat, A., Miralles, M.C. y Pérez-Martínez, G.** 1999. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* 87, 49-61.

- Vogel, R.F., Bocker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K.H. y Hammes, W.P. 1994. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 223-229.
- Vogel, R.F., Ehrmann, M. A. y Gänzle, M.G. 2002. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Anton. Leeuw.* 81, 631-638.
- Ward, L.J.H. y Timmins, M.J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 90-92.
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. y Alatosava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 297-303.
- Welsh, J. y McClelland, M. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR and a matrix of pair wise combinations of primers. *Nucleic Acids Res.* 19, 5275-5279.
- Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingei, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Wood, B.J.B. y Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Vol. 2. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Worobo, R.W., Henkel, T., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17A. *Microbiology* 140, 517-526.
- Worobo, R.W., VanBelkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. y Stiles, M.E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177, 3143-3149.
- Yang, R., Johnson, M.C. y Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3355-3359.
- Yap, P.S. y Gilliland, S.E. 2000. Comparison of newly isolated strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* for hydrogen peroxide production at 5 °C. *J. Dairy Sci.* 83, 628-632.

Bibliografía

Zanoni, P., Farrow, J.A., Phillips, B.A. y Collins, M.D. 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Paterson y Anderson) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 339-341.

Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. y Dellaglio, F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (5), 243-246.

Zhang, G. y Holley, R.A. 1999. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. *Food Microbiol.* 16, 633-644.

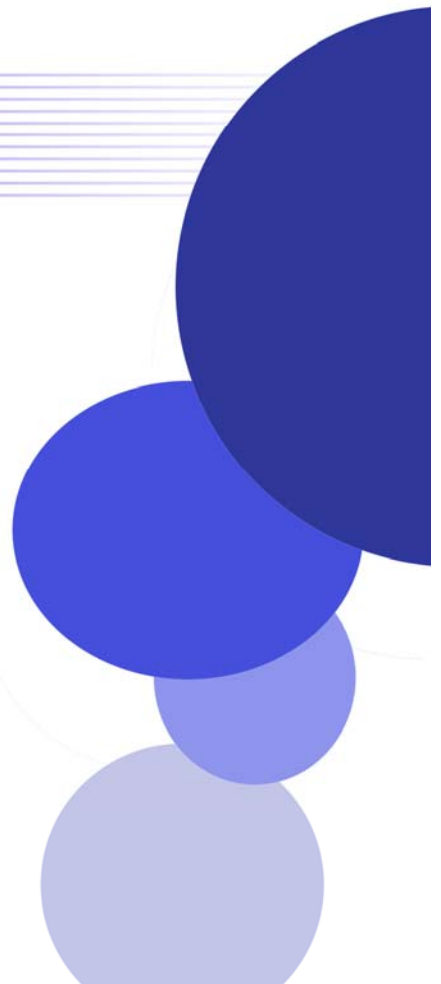
<http://www.hgmp.mrc.ac.uk>

<http://www.pasteur.fr/recherche/BNB>

<http://srs.ebi.ac.uk>

<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov>

Publicaciones



Parte del trabajo expuesto en esta memoria, ha quedado recogido en las siguientes publicaciones:

1. Seseña, S., Sánchez, I., González Viñas, M. A. y Palop, M. LI. 2001. Contribution of starter culture to the sensory characteristics of fermented 'Almagro' eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 67 (3), 197-205.
2. Seseña, S., Sánchez, I., González Viñas, M. A. y Palop, M. LI. 2002. Effect of freezing on the fermentation and sensory attributes of 'Almagro' eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 77 (1-2) 157-161.
3. Seseña, S., Sánchez, I. y Palop, M. LI. 2004. Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from "Almagro" eggplant fermentations from two seasons. *FEMS Microbiol. Lett.* 238 (1), 159-165.
4. Seseña, S. Sánchez, I. y Palop, M. LI. 2005. Characterization of *Lactobacillus* strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* En prensa.
5. Seseña, S. y Palop, M. LI. 2005. Genetic diversity of lactic acid microflora isolated from traditional Almagro eggplants manufacturing plants. En preparación.